

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA VEGETAL



**Papel da Via de Sinalização Mediada por Ire1 e
Xbp1 na Diferenciação de Fotoreceptores em
*Drosophila***

DINA RAQUEL DA SILVA COELHO

MESTRADO EM BIOLOGIA MOLECULAR HUMANA

2009

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA VEGETAL



Papel da Via de Sinalização Mediada por Ire1 e Xbp1 na Diferenciação de Fotoreceptores em *Drosophila*

DINA RAQUEL DA SILVA COELHO

Tese orientada pelos Prof.^{es} Doutores

Pedro M. Domingos

GRUPO DE *CELL SIGNALING IN DROSOPHILA*

INSTITUTO DE TECNOLOGIA QUÍMICA E BIOLÓGICA

e

Rui Gomes

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA VEGETAL

FACULDADE DE CIÊNCIAS DA UL

MESTRADO EM BIOLOGIA MOLECULAR HUMANA

2009

Resumo

O mecanismo de *Unfolded Protein Response* (UPR) protege as células do stress no retículo endoplasmático (RE) causado pela acumulação de proteínas *misfolded* no seu lúmen. Este mecanismo leva à activação de um conjunto de vias de sinalização que aumenta a capacidade de *folding* de proteínas no RE. No presente trabalho, analisámos o papel da via do UPR mediada por Ire1 e Xbp1 no desenvolvimento do olho de *Drosophila*, em particular na diferenciação dos fotoreceptores.

Descobrimos que a via de sinalização mediada por Ire1 e Xbp1 é activada nos fotoreceptores da pupa, nas fases críticas para a morfogénese do rabdómero (estrutura especializada dos fotoreceptores). É no rabdómero que o sinal luminoso é convertido em impulso nervoso, através de uma cascata de reacções nas quais participa a rodopsina. Demonstramos que Ire1 é essencial na morfogénese do rabdómero, visto que mutantes de Ire1 apresentam graves deficiências na morfologia dos fotoreceptores, com atrofia dos rabdómeros e perda do espaço inter-rabdomérico.

A morfogénese do rabdómero depende de um transporte direccionado de vesículas contendo proteínas como a Rodopsina 1, desde o RE até à membrana apical do fotoreceptor. Em mutantes de Ire1, a Rodopsina 1 não é transportada até à membrana apical onde se localiza o rabdómero e acumula-se no corpo celular. Estes resultados sugerem que a sinalização de Ire1/Xbp1 aumenta a capacidade do RE em sintetizar as proteínas destinadas ao rabdómero e estimula o seu transporte ao longo da via secretora.

Palavras-chave: diferenciação, fotoreceptor, retículo endoplasmático, sinalização celular

Abstract

The Unfolded Protein Response (UPR) protects cells from endoplasmic reticulum (ER) stress caused by the presence of misfolded proteins in the ER. The UPR activates a set of signaling pathways that increase the capacity of the ER to process the folding of client proteins. In this work we investigated the role of the Ire1/Xbp1 branch of the UPR in eye development in *Drosophila*, particularly photoreceptor differentiation during pupal stages.

We found that Ire1/Xbp1 signaling is active in the photoreceptors during pupal stages, when rhabdomere morphogenesis occurs. The rhabdomere is the structure in the photoreceptors where rhodopsins and the associated visual transduction cascade proteins localize. Here, we demonstrate that Ire1 is essential for rhabdomere morphogenesis, since Ire1 mutants show severe deficiencies in photoreceptors morphology: the rhabdomeres are smaller and irregular and the inter-rhabdomeral space is strongly reduced.

The morphogenesis of the rhabdomere requires the targeted delivery of secretory vesicles (containing Rhodopsin 1 and other proteins) from the ER into the developing rhabdomere in the apical membrane of the photoreceptor. In Ire1 mutants, Rhodopsin 1 fails to reach the rhabdomere and accumulates in the photoreceptors cellular body. These results suggest that Ire1/Xbp1 signaling is activated to increase the capacity of the ER in producing the secretory vesicles that contribute to the formation of the rhabdomere.

Key words: differentiation, photoreceptor, endoplasmic reticulum, cellular signaling

Agradecimentos

Este trabalho não teria sido possível sem a colaboração das seguintes pessoas e entidades, às quais estou profundamente grata:

Prof. José Martinho Simões, Director do ITQB, e Prof. António Coutinho, Director do IGC, que me permitiram desenvolver o meu trabalho nas instalações do ITQB I no IGC.

Fundação para a Ciência e Tecnologia e Fundação Marie Curie que financiaram o laboratório de *Cell Signaling in Drosophila*, onde fui acolhida durante este ano.

Pedro Domingos, o meu orientador e chefe. Obrigada pela paciência, disponibilidade, proximidade, boa-vontade, ajuda, entusiasmo, simpatia, incentivo. Por partilhar tantas e tantas “pérolas de sabedoria”, por me ensinar que “o óptimo é inimigo do bom”, por me fazer ver que há vida para lá do laboratório. E pelas boleias.

Rui Gomes, o meu supervisor na Faculdade, pela energia e prontidão com que contribuiu para a marcação da data de defesa da tese, por me incentivar no meu trabalho e pelo gosto em ajudar.

Fátima, a pós-Doc do laboratório, pelos conselhos científicos e pelo sentido de humor. Gonçalo, o meu colega mestrando, pela espontaneidade e amizade. Vanya, por contribuir para que eu me senta bem no laboratório. Tânia, a minha colega de bricolage e decoração.

Todos os grupos do IGC que trabalham com *Drosophila* e vizinhos do ITQB I, por partilharam reagentes e equipamento.

Técnicos do IGC que me prestaram apoio no microscópio e técnicos do ITQB.

Professor Luís Silva. Ana Raquel, Nuno e Mónica.

Diana e Joana.

As minhas pessoas.

A minha família.

Abreviaturas

% - Percentagem

μL – Microlitros

μm - Micrómetros

μM - Micromolar

2R – Braço direito do segundo cromossoma de *Drosophila*

3R – Braço direito do terceiro cromossoma de *Drosophila*

ATF6 - *Activating transcription factor 6*

bZIP – Domínio de fecho de leucinas básico

cAMP – Monofosfato de adenosina cíclico

cDNA – DNA produzido a partir de mRNA

CIP - *Calf intestinal alkaline phosphatase*

CO₂ - Dióxido de carbono

Col. - Colónia

CRE – *cAMP responsive element*

Cyo – Marcador genético dominante (*Curly of Oster*)

DNA - Ácido desoxirribonucleico

EGFP - *Enhanced green fluorescent protein*

Elav - *Embryonic lethal abnormal vision*

Exc. – Excisão

Fig. – Figura

FITC - Fluoresceína isotiocianato

FM7 – Balanceador do primeiro cromossoma

FRT - *Flipase recombination target*

GMR - *Glass multimer reporter*

h - Horas

Ire1 - *Inositol-requiring enzyme 1*

JNK - *Jun N-terminal kinase*

Ki - marcador genético dominante (*Kinked*)

lacZ - codifica a β-galactosidase

min - minutos

mRNA – RNA mensageiro

ND – não digerido

ninaE - *Neither inactivation nor afterpotential E* (gene que codifica a Rodopsina 1)

°C – graus Celsius

PBS - *Phosphate buffered saline*

PBT - *Phosphate buffered saline triton*
PERK - *Pancreatic ER kinase (PKR)-like ER Kinase*
R1-R8 – Fotoreceptores 1 a 8
Rab11 - *Rab-protein 11*
RE- Retículo endoplasmático
Rh1 – Rodopsina 1
RNA - Ácido ribonucleico
RNAi – RNA de interferência
RT-PCR - *Reverse transcription polymerase chain reaction*
s - Segundos
Sb – Marcador genético dominante (*Stubble*)
Sco – Marcador genético dominante (*Scutoid*)
Spam – Proteína *Spacemaker*
TAE - Tris-acetato-EDTA
TM6B – Balanceador do 3º cromossoma de *Drosophila*
TRAF - TNF Receptor Associated Factor
uas – *Upstream activation sequence*
ubi - Gene da Ubiquitina
UPR - *Unfolded protein response*
UPRE - *Unfolded protein response element*
UTR – *untranslated region*
w – gene *white*
Xbp1 - *X-box binding protein 1*

Índice

1. Introdução

1.1 O desenvolvimento do olho de <i>Drosophila</i>	
1.1.1 O olho composto de <i>Drosophila</i>	1
1.1.2 Diferenciação de fotoreceptores e morfogénese do rabdómero.....	1
1.2 <i>Unfolded Protein Response</i>	
1.2.1 Stress no retículo endoplasmático	3
1.2.2 A via de sinalização mediada por Ire1 e Xbp1	5
1.2.3 A via mediada por Ire1 e Xbp1 na degeneração de fotoreceptores.....	7
1.3 Objectivos do trabalho	8

2. Materiais e métodos

2.1 Genética de <i>Drosophila melanogaster</i>	
2.1.1 Manutenção das linhas	8
2.1.2 Cruzamentos.....	8
2.1.3 Purificação de RNA total de larva e RT-PCR.....	10
2.1.4 Mapeamento das excisões imprecisas de $P\{lacW\}^{k13803}$	10
2.2 Imunohistoquímica e Microscopia	
2.2.1 Imunohistoquímica de discos imaginais de larva.....	11
2.2.2 Imunohistoquímica de olhos de pupa e adulto.....	11
2.2.3 Criosecções de olhos de pupa e adulto	11
2.2.4 Anticorpos utilizados e montagem das amostras.....	11
2.2.5 Técnica de imersão.....	12
2.3 Técnicas de Biologia Molecular	
2.3.1 Electroforese em gel de agarose	12
2.3.2 Extracção de DNA de gel de agarose.....	12
2.3.3 Reacções de restrição, desfosforilação e ligação.....	12
2.3.4 Extracção fenólica de DNA	13
2.3.5 Transformação de células competentes	13

2.3.6 Purificação de DNA plasmídico	13
2.3.7 Clonagem de cDNA de Ire1 em pUAST	13
3. Resultados e Discussão	
3.1 Mapeamento espacial e temporal da activação da sinalização mediada por Ire1 e Xbp1 durante o desenvolvimento do olho	14
3.2 Análise de clones de <i>ire1</i> ^{f02170} no olho	16
3.3 <i>Knock-down</i> de <i>ire1</i> por RNAi	20
3.4 Efeito da mutação <i>xbp1</i> ^{k13803} na morfologia dos fotoreceptores	21
3.5 Excisão imprecisa de <i>P{lacW}</i> ^{k13803}	22
3.6 Clonagem de Ire1	24
4. Conclusão	27
5. Bibliografia	28
6. Anexo	34

Índice de imagens

Fig. 1 Aspecto dos omatídeos do olho de <i>Drosophila</i> .	1
Fig. 2 Recrutamento dos fotoreceptores no disco imaginal do olho de larva do 3º estágio.	2
Fig. 3 A diferenciação dos fotoreceptores e morfogénese do rabdómero.	3
Fig. 4 A via de sinalização do UPR mediada por Ire1 e Xbp1.	6
Fig. 5 O repórter de stress no RE: Xbp1-EGFP.	7
Fig. 6 Expressão de Xbp1-EGFP na larva, pupa e adulto.	15
Fig. 7 Clones de <i>ire1</i> ^{f02170} em discos imaginais do olho de larva e em olhos de pupa de 48h e de pupa de 72h.	17
Fig. 8 Clones de <i>ire1</i> ^{f02170} num plano distal e num plano proximal do olho às 72h de desenvolvimento na pupa.	18
Fig. 9 Efeito do <i>knock-down</i> de <i>ire1</i> em olhos de adulto.	20
Fig. 10 Extensão do gene <i>xbp1</i> no braço direito do segundo cromossoma (2R).	21
Fig. 11 Estratégia de PCR utilizada para determinar o resultado da excisão de <i>P{lacW}</i> ^{k13803} na região genómica de <i>xbp1</i> .	23
Fig. 12 Extensão do gene <i>ire1</i> no braço direito do terceiro cromossoma (3R).	12
Fig. 13 Obtenção de pUAST-Ire1.	13
Fig. 14 Sequenciação do cDNA de <i>ire1</i> clonado em pUAST.	27

Anexo

Fig. 1 Mapas de restrição de pJET e pUAST.	36
Fig. 2 O repórter Xbp1-EGFP é activado por stress no RE e localiza-se no núcleo.	37
Fig. 3 Defeitos estruturais em fotoreceptores de olho formado por um clone <i>ire1</i> ^{f02170} em adulto.	38
Fig. 4 Secção tangencial de olho formado a partir de um clone <i>P{lacW}xbp1</i> ^{k13803} em adulto.	38

1. Introdução

1.1 O desenvolvimento do olho de *Drosophila*

1.1.1 O olho composto de *Drosophila*

O olho de *Drosophila* é constituído por cerca de 800 unidades funcionais com forma aproximadamente hexagonal, os omatídeos (**Fig. 1A**). Cada omatídeo contém 8 neurónios especializados na captação de estímulos visuais - os fotoreceptores (R1-R8) - e um número invariável de células acessórias, tais como os cones e células do pigmento. Os fotoreceptores possuem um organelo especializado, o rabdómero, onde se acumula a rodopsina e outras proteínas da cascata de transdução do sinal visual em impulso nervoso. A membrana do rabdómero apresenta um empilhamento de microvilosidades ligadas entre si, aumentando a superfície fotossensível de cada fotoreceptor^[1]. Em cada omatídeo, os rabdómeros dos 6 fotoreceptores que ocupam uma posição mais externa (R1-R6) rodeiam os rabdómeros dos fotoreceptores centrais (R7/R8, sendo que o de R7 está numa posição mais distal que o de R8), formando um padrão trapezoidal (**Fig. 1B**).

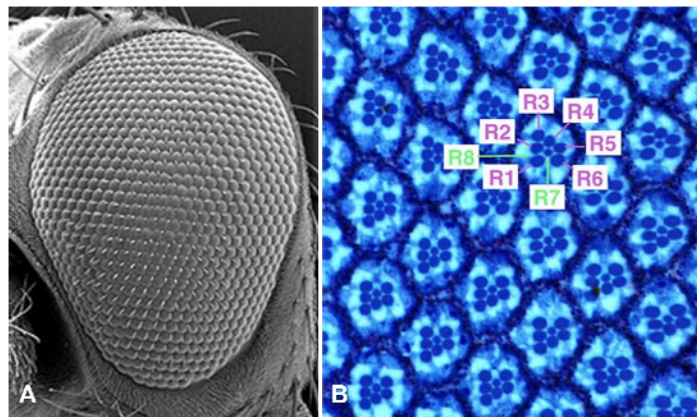


Figura 1. Aspecto dos omatídeos do olho de *Drosophila*. (A) Imagem de microscopia electrónica de varrimento do exterior do olho, evidenciando a organização dos omatídeos. (B) Secção tangencial de um olho, mostrando a disposição característica dos fotoreceptores R1 – R6 em cada omatídeo, com R7 no interior e R8 fora deste plano de secção.

1.1.2 Diferenciação de fotoreceptores e morfogénese do rabdómero

A formação dos omatídeos inicia-se no disco imaginal do olho no terceiro estágio larvar. Depois da passagem do sulco morfogénético, ocorre o recrutamento/especificação sucessivo dos 8 fotoreceptores, que adquirem uma identidade e posição próprias em cada omatídeo^[2,3] (**Fig. 2**). A diferenciação dos fotoreceptores dá-se após o recrutamento/especificação, só terminando com a eclosão do adulto. Durante a diferenciação, os fotoreceptores sofrem uma rotação de 90° do domínio apical e um alongamento ao longo de toda a profundidade da retina^[4] (**Fig. 3A,B**).

Disco imaginal do olho

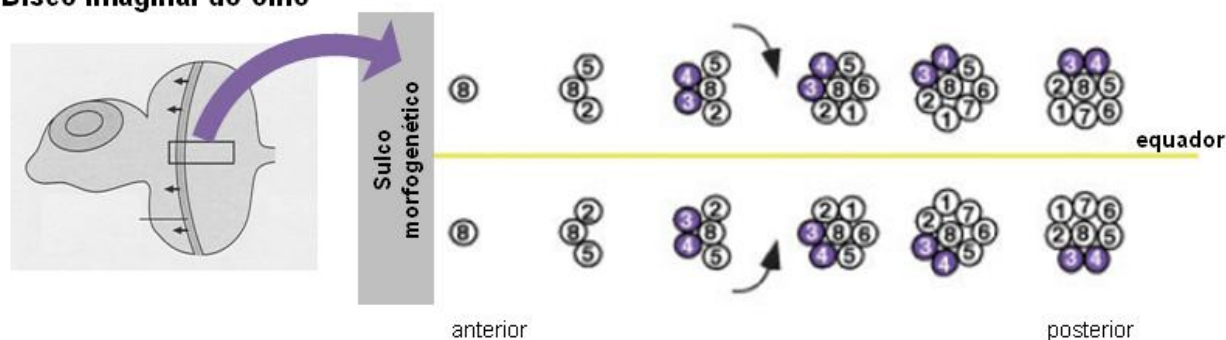


Figura 2. Recrutamento dos fotoreceptores no disco imaginal do olho de larva do 3º estágio. O sulco morfogenético inicia-se na parte posterior do disco imaginal do olho e vai-se deslocando para a parte anterior. Após a passagem do sulco morfogenético, um conjunto de sinais emitidos e recebidos pelas células do epitélio, envolvendo moléculas como *Spitz* e *Notch*, leva à especificação progressiva dos fotoreceptores, pela ordem indicada na figura^[5].

A maturação dos fotoreceptores, incluindo a morfogénese do rabdomero e o início da expressão de rodopsina, ocorre durante os estádios de pupa (metamorfose)^[6,7]. Nesta fase do desenvolvimento, a superfície da membrana apical dos fotoreceptores expande-se e individualizam estruturas digitiformes suportadas por actina, que constituirão as microvilosidades do rabdomero^[8]. Durante este processo, inicia-se a síntese de Rodopsina 1, a qual é sintetizada e glicosilada no RE, transportada em vesículas ao longo do percurso RE-Golgi-membrana apical e inserida na membrana do rabdomero.

O rabdomero contacta através das extremidades das microvilosidades com o espaço inter-rabdomérico e liga-se por um pedúnculo à *zonula adherens*, a qual separa a membrana basolateral e a membrana apical do fotoreceptor^[9] (**Fig. 3B**).

Sendo os fotoreceptores células fortemente polarizadas, existem proteínas que se distribuem desigualmente nas duas membranas (apical ou basolateral) e que modulam a expansão da membrana apical (**Fig. 3C**). Por exemplo, a proteína transmembranar *Crumbs* localiza-se no pedúnculo e recruta *Stardust* e *Discs lost*, contribuindo para a especificação da membrana apical. *Armadillo* situa-se exclusivamente na *zonula adherens* e contribui também para a polarização dos fotoreceptores. *Crumbs* desempenha ainda outra função na diferenciação dos fotoreceptores: liga-se ao citosqueleto actínico, o que conduz ao alongamento do pedúnculo nessa zona por diminuição do número de internalizações da membrana plasmática^[10,11,12] (**Fig.3C**).

Este crescimento do rabdomero depende ainda de um intenso tráfego vesicular secretório que permite o transporte de proteínas envolvidas na transdução do sinal visual até à membrana apical fotossensível. Rab11, uma GTPase que regula as interações membranares nas vias endocíticas e exocíticas, é essencial no transporte pós-Golgi de

vesículas contendo rodopsina. Quando a actividade de Rab11 é diminuída, as vesículas com rodopsina acumulam-se no citoplasma e não vão para o rabdómero^[13].

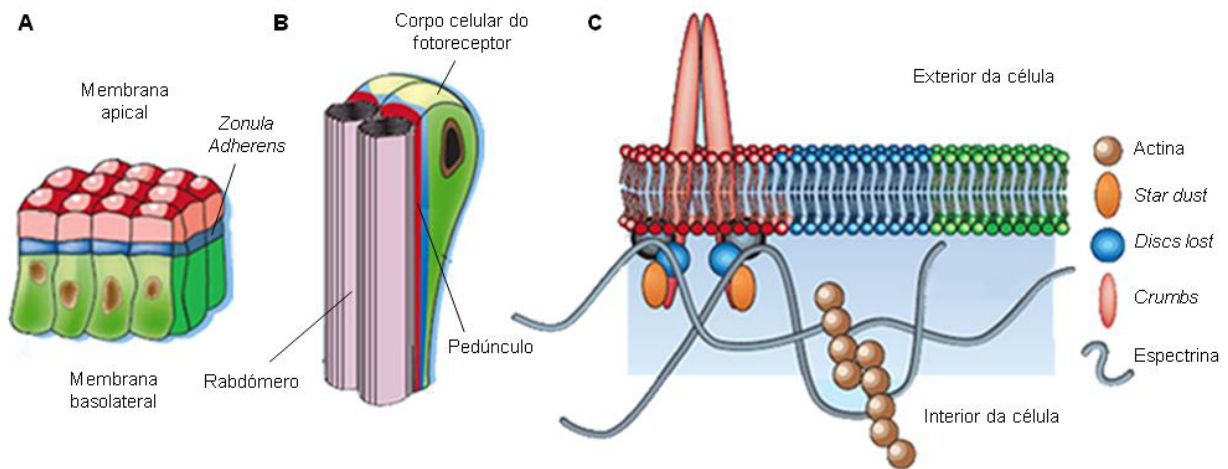


Figura 3. A diferenciação dos fotoreceptores e morfogénese do rabdómero. A membrana apical (incluindo o pedúnculo) está representada a vermelho, a membrana basolateral está representada a verde e a *zonula adherens* está representada a azul. (A) Na larva, os discos imaginais do olho, a partir dos quais se vão formar os fotoreceptores e todas as outras células do olho adulto, são constituídos maioritariamente por células epiteliais. (B) As células do epitélio que são recrutadas como fotoreceptores sofrem uma rotação de 90° e a sua membrana apical fica numa posição lateral. Durante a diferenciação do fotoreceptor na pupa, o rabdómero é formado na membrana apical. Aquando da eclosão do organismo adulto, os fotoreceptores apresentam já a organização representada em B. (C) *Crumbs* localiza-se na membrana do pedúnculo que liga o rabdómero ao corpo celular do fotoreceptor, contribuindo para a polarização da célula. Recruta *Stardust* e *Discs lost* e liga-se a microfilamentos actínicos através de proteínas adaptadoras como a Espectrina. Desta forma contribui para a manutenção da polarização celular e para o alongamento do pedúnculo^[12].

Um estudo recente veio acrescentar que Rab11 desempenha este papel complexada com a proteína motora *Myosin V* e com a proteína adaptadora dRip (*Drosophila Rab11 interacting protein*). *Myosin V* está envolvida no transporte e *targeting* das vesículas com rodopsina. Em mutantes de *Myosin V*, surgem rabdómeros ectópicos nos fotoreceptores. Os autores do estudo sugerem que este transporte das vesículas é feito ao longo de filamentos de actina da rede subcortical terminal até à base do rabdómero^[14].

1.2 Unfolded Protein Response

1.2.1 Stress no retículo endoplasmático

O retículo endoplasmático (RE) é um complexo membranar onde as proteínas destinadas à membrana plasmática e ao espaço extracelular são sintetizadas e modificadas. Estas proteínas membranares e extracelulares são sintetizadas por ribossomas acoplados à

face citosólica do RE. À medida que são traduzidas, estas proteínas são translocadas para o lúmen do RE^[15,16].

No RE, o polipéptido nascente sofre um processo de *folding* que depende da sequência e propriedades dos seus aminoácidos. Durante o processo de *folding*, chaperones do RE, como a BiP, ligam-se às zonas hidrofóbicas da cadeia polipeptídica e protegem-nas de interações inapropriadas com outras moléculas^[17,18]. No RE, o polipéptido é ainda sujeito a alterações pós-traducionais: glicosilação e lipidação. Após passar com sucesso por todos os eventos de *folding* e modificação pós-traducional, a proteína adquire a sua conformação nativa, abandona o retículo endoplasmático e segue para o Golgi^[19,20,21].

As proteínas que falham em adquirir a sua conformação nativa, proteínas *misfolded*, são encaminhadas para a via de degradação associada ao RE. Nesta via, as proteínas que passam por várias tentativas falhadas de *folding* são marcadas como *misfolded* e retrotranslocadas desde o lúmen do RE até ao citoplasma, onde são degradadas pelo sistema de ubiquitina-proteossoma^[22].

Para além de terem a sua estrutura tridimensional e função fisiológica alteradas, as proteínas *misfolded* constituem um risco para a célula pois têm o potencial de interagir de forma inespecífica entre si e com outros componentes celulares. Destas interações inespecíficas podem resultar complexos insolúveis, mais ou menos organizados, que estão associados com várias patologias^[23,24].

O funcionamento “normal” das células depende da eficiência do RE em processar e assistir ao *folding* das proteínas destinadas à membrana plasmática e ao espaço extracelular. Em consequência de um processo de diferenciação ou de alterações fisiológicas da célula, a quantidade de proteínas sintetizadas no RE pode sofrer um rápido aumento. Por outro lado, mutações na sequência de aminoácidos das proteínas ou situações de stress celular, energético ou oxidativo, podem provocar a diminuição da capacidade de *folding* do RE. Em consequência, a sobrecarga de proteínas no lúmen do RE pode levar à acumulação de proteínas *misfolded* e originar stress no RE^[25].

Por forma a combater o stress no RE e restituir o normal funcionamento celular, um mecanismo homeostático, conhecido por *Unfolded Protein Response* (UPR), evoluiu nos eucariotas^[26,27]. Neste mecanismo, é desencadeada uma resposta sequencial ao stress no RE por activação de um conjunto de vias de sinalização. Primeiro, ocorre a atenuação da tradução de proteínas, diminuindo a quantidade de proteínas no lúmen do RE. Posteriormente, ocorre a activação transcricional de chaperones do retículo e de outras enzimas que assistem ao *folding* das proteínas, com subsequente aumento da capacidade de *folding* do RE. Por último, ocorre a activação da transcrição de genes que codificam a maquinaria de retrotranslocação e degradação de proteínas *misfolded* acumuladas no RE^[28,29,30].

Contudo, nos casos em que o stress no retículo endoplasmático é severo e prolongado, o mecanismo de *UPR* pode não ser suficiente para contrabalançar as causas do stress no RE, e a célula acaba por morrer por apoptose, uma forma de morte celular programada^[25].

Nos mamíferos, o mecanismo de *UPR* é iniciado por três proteínas transmembranares do RE: *Pancreatic ER kinase (PKR)-like ER kinase* (PERK), *Activating transcription factor 6* (ATF6) e *Inositol-requiring enzyme 1* (Ire1). Estas proteínas funcionam como sensores, sendo capazes de detectar a acumulação de proteínas *misfolded* no lúmen do ER e activar efectores do UPR no citoplasma^[31].

1.2.2 A via de sinalização mediada por Ire1 e Xbp1

Ire1 é uma proteína transmembranar do RE conservada em todos os eucariotas, desde plantas a mamíferos^[32,33]. A proteína Ire1 possui dois domínios: um domínio luminal de dimerização, envolvido no reconhecimento de proteínas *misfolded* e um domínio citoplasmático, com actividades de cinase e endoribonuclease.

O processo pelo qual Ire1 é activada após a acumulação de proteínas *misfolded* no RE ainda não foi totalmente esclarecido. O modelo mais aceite defende que, na ausência de stress no RE, o chaperone BiP do RE liga-se ao domínio luminal de Ire1 e reprime a sua actividade. Quando proteínas *misfolded* se acumulam no RE, a chaperone BiP é recrutada para promover o *folding* destas proteínas e dissocia-se de Ire1^[34,35]. Nestas condições, os monómeros de Ire1 oligomerizam e auto-fosforilam-se, ficando Ire1 activada. Outro modelo sugere que Ire1 consegue detectar directamente a presença de proteínas *misfolded* no RE através do seu domínio luminal^[36]. Neste caso, a activação de Ire1 seria provocada pela ligação directa de proteínas *misfolded* ao sulco formado pela oligomerização de Ire1.

A via de sinalização mediada por Ire1 foi primeiramente descrita em levedura (*S. cerevisiae*)^[37,38]. Neste organismo, a proteína Ire1, quando activada pelo stress no RE, cliva o mRNA do factor de transcrição Hac1 em dois locais, permitindo a excisão de um intrão de 252 nucleótidos^[39]. A remoção do intrão e subsequente ligação dos dois exões, provoca um *frameshift* que permite que o mRNA seja traduzido e origine um factor de transcrição funcional^[40,41].

Nos metazoários, Ire1 catalisa a remoção de um intrão do homólogo funcional de Hac1, a proteína Xbp1 (*X-box binding protein 1*) (**Fig. 4**). O mecanismo de *splicing* nos metazoários é semelhante ao de levedura com a diferença que o intrão de Xbp1 é mais pequeno (tem apenas 26 nucleótidos). No caso de Xbp1, ao contrário de Hac1, quer a forma *spliced*, quer a forma *unspliced* do mRNA são traduzidas e originam proteínas. Todavia, apenas a forma *spliced* de Xbp1 origina um factor de transcrição eficiente. A remoção do intrão de Xbp1 causa um *frameshift* durante a tradução que introduz um novo domínio C-terminal na proteína, essencial para a activação da expressão de outros genes (domínio de

trans-activação)^[42,43]. Pensa-se que Xbp1*unspliced* funcione como um regulador negativo de Xbp1*spliced*, ligando-se a esta forma e encaminhando-a para degradação^[44].

Xbp1 (nos metazoários) e Hac1 (em levedura) são factores de transcrição que se ligam ao DNA através de um fecho básico de leucinas (bZIP). Estas proteínas regulam a expressão de genes-alvo com elementos específicos nos seus promotores: Hac1 liga-se a *UPR elements* e Xbp1 liga-se a *CRE (cAMP responsive element)-like elements*. Os genes-alvo codificam chaperones do RE, proteínas envolvidas na biogénese do RE, componentes da via de degradação de proteínas associada ao RE e moléculas envolvidas no controlo de qualidade de proteínas do RE^[45-50].

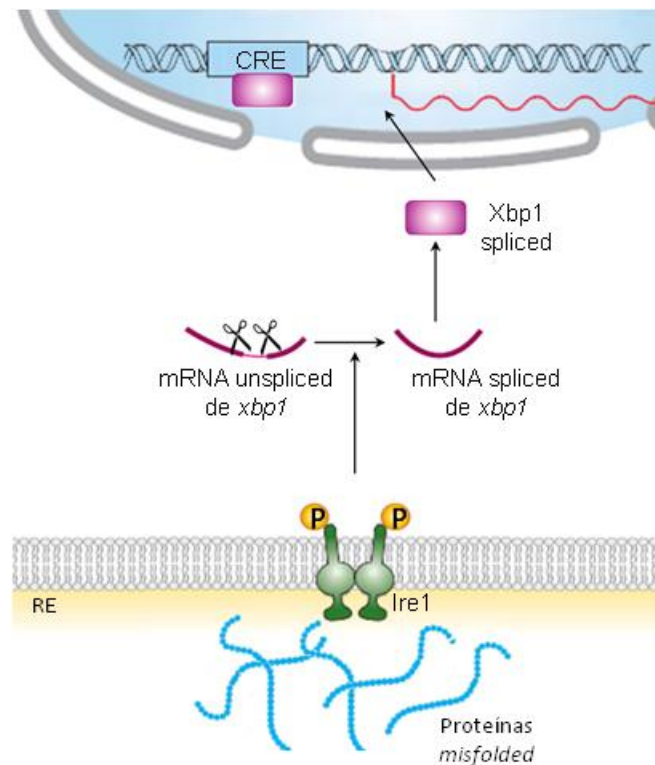


Figura 4. A via de sinalização do UPR mediada por Ire1 e Xbp1. Mediante a acumulação de proteínas *misfolded* no RE, Ire1 é activada e faz o *splicing* de um pequeno intrão do mRNA de *xbp1*. A partir do mRNA *spliced* de *xbp1* é produzido um factor de transcrição funcional, Xbp1*spliced*, que é transportado até ao núcleo onde activa a expressão de genes-alvo.

Nos mamíferos, ao contrário do que acontece em levedura, o mRNA de *xbp1* não é o único substrato de Ire1. A proteína Ire1 pode interagir com *TNF-receptor-associated factor* (TRAF), formando um complexo que é responsável por iniciar a cascata de fosforilação que activa a cinase *Jun-N-terminal kinase* (JNK)^[51]. Em células S2 de *Drosophila*, Ire1 tem ainda a capacidade de, directa ou indirectamente, mediar a degradação de mRNAs de proteínas que são clientes do RE, diminuindo assim a “carga” sobre o RE que já está a sofrer “stress”^[52].

1.2.3 A via mediada por Ire1 e Xbp1 na degeneração de fotoreceptores

Dados recentes indicam que a sinalização de Ire1/Xbp1 tem um papel relevante na protecção contra a degeneração da retina num modelo em *Drosophila* de Retinite Pigmentosa^[53]. Nesta doença, os fotoreceptores degeneram ao longo do tempo. Os indivíduos afectados sofrem de cegueira nocturna, seguida por perda da visão central e periférica^[54]. Cerca de 30% dos casos de Retinite Pigmentosa são causados por mutações na rodopsina humana. Em *Drosophila*, mutações equivalentes em Rodopsina 1 (codificada por *ninaE*) também levam à degeneração progressiva da retina. A Rodopsina 1 apresenta uma homologia de 22% na sequência de aminoácidos com a rodopsina humana. Foi demonstrado que mutações nas porções transmembranar ou extracelular de Rodopsina 1 interferem com o seu *folding* normal, causando stress no RE com posterior degeneração dos fotoreceptores (através de mediadores apoptóticos ainda não identificados)^[55-58].

Usando um conjunto de alelos de *ninaE* com características moleculares e fenotípicas idênticas àsquelas encontradas em Retinite Pigmentosa, o meu orientador e colegas provaram que Xbp1 tem um papel protector contra a degeneração da retina^[53]. Neste estudo, foi construída uma proteína de fusão entre Xbp1 e EGFP, na qual a grelha de leitura da EGFP apenas está em *frame* com a grelha de leitura de Xbp1 após o *splicing* mediado por Ire1 (e durante condições de stress no RE) (**Fig. 5**). Este reagente, Xbp1-EGFP funciona como um “repórter” que detecta stress no RE e a activação de Ire1. Nas mutações dominantes de *ninaE* há activação de Xbp1-EGFP, o que implica que a via de sinalização mediada por Ire1 e Xbp1 é activada nos mutantes de Rodopsina 1 que mostram degeneração da retina^[53].

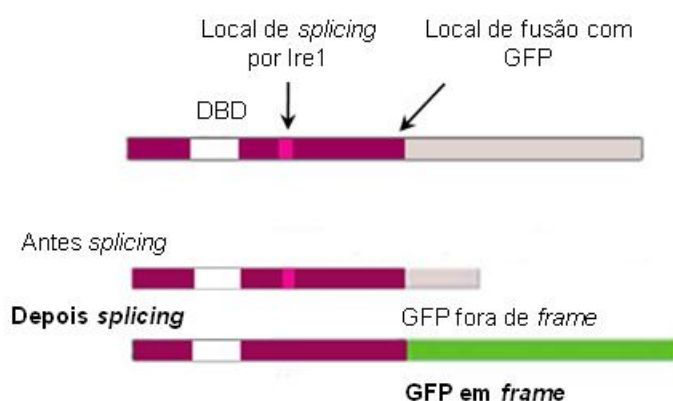


Figura 5. O repórter de stress no RE: Xbp1-EGFP. O gene da EGFP foi clonado a jusante do pequeno intrão que é removido por Ire1. Antes do *splicing*, ou seja, em situações em que Ire1 não esteja activada, o gene da EGFP está fora de *frame*, é introduzido um codão stop e não é produzida uma proteína funcional. Em condições de stress no RE, Ire1 é activada e remove o intrão de *xbp1*, causando um *frameshift* que coloca o gene da EGFP em *frame*. Nestas condições, é produzida a proteína de fusão Xbp1-EGFP que funciona como repórter do stress no RE^[53]. DBD: DNA Binding Domain.

1.3 Objectivos do trabalho

Apesar destas últimas descobertas que associam o mecanismo de UPR com apoptose e degeneração de fotoreceptores em *Drosophila*, ainda não foi esclarecido se esta resposta celular tem também algum papel durante a diferenciação dos fotoreceptores. Durante experiências preliminares, o meu orientador observou que o repórter Xbp1-EGFP é activado durante a diferenciação dos fotoreceptores. Este resultado levou-nos a colocar a hipótese de que a via mediada por Ire1 e Xbp1 é activada durante a diferenciação dos fotoreceptores para aumentar a capacidade do RE em sintetizar Rodopsina 1 e outras proteínas, que são transportadas em vesículas para o rabdómero em formação.

De molde a esclarecer o papel de Ire1 e Xbp1 na diferenciação dos fotoreceptores, o presente trabalho tem os seguintes objectivos:

1. Mapeamento espacial e temporal da activação da sinalização mediada por Ire1 e Xbp1 durante o desenvolvimento do olho
2. Determinação do papel de Xbp1 e Ire1 na morfogénese do rabdómero
3. Determinação de um eventual fenótipo causado pelo *knock-down* de Ire1 e Xbp1 por RNAi
4. Obtenção de uma mutação nula de *xbp1* e clonagem de Ire1 num vector de expressão em *Drosophila*

2. Materiais e métodos

2.1 Genética de *Drosophila melanogaster*

2.1.1 Manutenção das linhas

Todas as moscas foram mantidas em alimento com farinha de milho, açúcar, melaço, agar e nipagina 10% (em etanol) e incubadas a 25°C, no caso dos cruzamentos, ou a 18°C, para preservação das linhas. A incubação teve um ciclo diário de 12h de luz seguidas de 12h de escuridão.

2.1.2 Cruzamentos

Os cruzamentos realizados são explicados brevemente de seguida (**Anexo** para esquemas dos cruzamentos):

i) Activação da via mediada por Ire1 e Xbp1

O mapeamento da activação da sinalização mediada por Ire1 e Xbp1 foi feito em moscas com o genótipo *w;GMR-Gal4/pWIZ-wΔ13;uas-xbp1-EGFP/TM6B*. As linhas originais

utilizadas na obtenção deste genótipo foram: *GMR-Gal4* (linha de Gal4 com padrão de expressão posterior ao sulco morfogênico nos discos imaginais da larva^[59]); *uas-xbp1-EGFP* (linha com uma construção de fusão entre Xbp1 e EGFP, na qual a EGFP apenas está em *frame* após o *splicing* de *xbp1* catalisado por Ire1^[53]); e *pWIZ-wΔ13* (linha de RNAi que silencia o gene *white*^[60]).

ii) Geração de clones mutantes de Ire1 no olho

Para gerar clones mutantes de Ire1 no olho, utilizou-se a técnica de Flipase/FRT que permite a recombinação mitótica entre locais específicos de cromossomos homólogos e a obtenção de mosaicos^[61]. A Flipase foi expressa no olho sob controle do promotor de *eyeless*^[62]. Utilizaram-se machos *w/y; Sco/Cyo; FRT82BPBac{WH}ire1^{f02170}/TM6B* (inserção letal do transposão *PBac{WH}* na sequência codificante de *ire1* re combinada num cromossoma FRT), no cruzamento com virgens *eyFlp;; FRT82BubiGFP/TM6B* (GFP re combinado em cromossomas FRT). Os clones homozigóticos para a mutação de *ire1* foram negativamente marcados pela ausência de GFP. O alelo mutante *ire1^{f02170}* foi obtido a partir de *Bloomington Drosophila Stock Center*.

No caso do *imaging* de olhos de adultos e de pupas de fases tardias do desenvolvimento, foi acrescentado o *pWIZ-wΔ13* através de um cruzamento prévio, para diminuir a interferência provocada pela auto-fluorescência do pigmento do olho.

iii) Excisão imprecisa de *P{lacW}^{k13808}*

Para produzir um mutante nulo de *xbp1*, cruzou-se a linha que possui a inserção do elemento *P{lacW}^{k13808}* na região 5'UTR de *xbp1* com a linha que codifica a transposase *P\T^{Δ2-3}*. Neste caso, o cruzamento parental foi: virgens *w; xbp1^{k13808}/Cyo* (*Bloomington Drosophila Stock Center*) x machos *w/y; Sco/Cyo; P\T^{Δ2-3}, Ki/TM6B*.

Seleccionaram-se machos *w/y; xbp1^{k13803}/Cyo; P\T^{Δ2-3}, Ki/+* que apresentam simultaneamente o *P{lacW}^{k13808}* e a transposase *P\T^{Δ2-3}*. Nesta combinação genética, a transposase pode eventualmente provocar a excisão de *P{lacW}^{k13808}* de uma forma imprecisa, com parte da sequência codificante de *xbp1* a ser mobilizada conjuntamente com o elemento P.

Cruzaram-se os machos anteriormente obtidos *w/y; xbp1^{k13803}/Cyo; P\T^{Δ2-3}, Ki/+* com virgens balanceadas no 2º e 3º cromossomas, de forma a balancear todas as excisões.

Cada excisão balanceada foi cruzada com a linha parental *w; xbp1^{k13808}/Cyo*, a fim de determinar a complementaridade ou letalidade entre a excisão e a mutação original causada pela inserção de *P{lacW}^{k13808}* em *xbp1*.

iv) *Knock-down* de Ire1 e Xbp1

Nas experiências de *knock-down* de Ire1 e Xbp1, a expressão das construções de RNAi foi induzida pelas seguintes linhas de Gal4: *Rh1-Gal4* (expressão tardia nos fotoreceptores exteriores (R1-R6) da pupa^[63]) e *GMR-Gal4* (expressão precoce - nos discos imaginais do olho após o sulco morfogénico^[59]). As linhas com as construções de RNAi para Ire1 (*P{GD3071}*) e Xbp1 (*P{GD4745}*) são provenientes do *Vienna Drosophila RNAi Center*.

2.1.3 Purificação de RNA total de larva e RT-PCR

Dissecaram-se em PBS cérebros e discos imaginais do olho de cerca de trinta larvas do terceiro estágio. Após duas lavagens rápidas em água *miliQ*, os cérebros e discos imaginais foram transferidos para um *eppendorf* e congelados em azoto líquido. Com o auxílio de um homogenizador, esmagaram-se os tecidos congelados em tampão de lise e procedeu-se à purificação de RNA total a partir dos tecidos esmagados utilizando o *kit High Pure RNA Tissue* (Roche).

A qualidade do RNA total purificado foi confirmada por electroforese. O RNA purificado foi utilizado como molde numa reacção de RT-PCR preparada com o *kit SuperScript III One-Step RT-PCR System with Platinum Taq High Fidelity* (Invitrogen). Os oligonucleótidos utilizados foram desenhados para a isoforma Ire1-PB e introduzem locais de restrição *Bgl*II e *Acc*65I: Forward - 5'GGA AGA TCT ATG AGA TTC TGC GTT GTT GTT G3' e Reverse - 5'CGG GGT ACC TCA ATC CTG CGT TGA AGG TGG3'. Em cada reacção, adicionaram-se 500ng de RNA molde, 1µl de cada um dos oligonucleótidos (10µM), 25µl da mistura de reacção, 1µl de enzima e 21µl de água *miliQ*, num volume total de 50µl. As condições de reacção foram as seguintes: síntese de cDNA (30min a 55°C), desnaturação inicial (2min a 94°C), seguida de 40 ciclos de desnaturação (15s a 94°C), emparelhamento dos oligonucleótidos (30s a 55°C) e extensão da cadeia (3min a 68°C), e uma extensão final de 5min a 68°C.

O cDNA de Ire1 foi isolado por electroforese e purificado através do *kit QIAquick Gel Extraction* (Qiagen).

2.1.4 Mapeamento das excisões imprecisas de *P{lacW}*^{k13803}

As excisões letais de *P{lacW}*^{k13803} foram balanceadas com *Cyo-GFP* e a linha de cada excisão foi transferida para placas de sumo de maçã incubadas a 25°C. Recolheram-se larvas homozigóticas para a excisão, distinguíveis pela perda do balanceador *Cyo-GFP*. Extraiu-se DNA genómico das larvas recolhidas utilizando o *kit High Pure PCR Template Preparation* (Roche).

A fim de rastrear a sequência genómica de *xbp1* das excisões letais obtidas, realizaram-se reacções de PCR combinando oligonucleótidos que se ligam a diferentes moldes na

região flanqueante ao local de inserção de *P[lacW]^{k13808}*. A lista de oligonucleótidos utilizados encontra-se na **Tab.1 do Anexo**.

Os produtos de amplificação obtidos por PCR cujo peso molecular não correspondia ao tamanho previsto da sequência-alvo foram purificados pelo kit *High Pure PCR Product* (Roche) e sequenciados (Stabvida).

2.2 Imunohistoquímica e Microscopia

2.2.1 Imunohistoquímica de discos imaginais de larva

Os discos imaginais do olho de larvas do 3º estágio foram dissecados em PBS 1X, fixados numa solução de PBS 1X + formaldeído 4% durante 20 min, à temperatura ambiente e lavados três vezes durante 10 min em PBT (PBS 1X + Triton-X 0,3%). As amostras foram incubadas nos anticorpos primários diluídos em PBT, durante 16h-18h, a 4°C e com agitação constante. As amostras foram lavadas 3 vezes, durante 10 min, em PBT e incubadas com o anticorpo secundário apropriado durante 2h com agitação, à temperatura ambiente. Repetiram-se três lavagens, de 10 min cada, em PBT.

2.2.2 Imunohistoquímica de olhos de pupa e adulto

A dissecação de olhos de pupa e adulto foi feita de acordo com Pichaud^[64]. A fixação e imunomarcação foram realizadas como descrito acima para os discos imaginais de larva.

Para fazer o *staging* das pupas, recolheram-se prepupas brancas (0h de desenvolvimento na pupa) e registou-se o tempo decorrido a 25°C^[65].

2.2.3 Criosecções de olhos de pupa e adulto

As criosecções (secções congeladas de olho) obtiveram-se do seguinte modo: as cabeças foram embebidas no composto O.C.T. (*Optimal Cutting Temperature*; Tissue Tek), congeladas rapidamente a -20°C, cortadas num crióstato em fatias de 10µm de espessura, transferidas para lâminas e fixadas durante 20 min em PBS 1X + formaldeído 4%. A marcação das criosecções com anticorpos foi efectuada da mesma forma que na histoquímica de discos imaginais de larva.

2.2.4 Anticorpos utilizados e montagem das amostras

Os anticorpos primários foram diluídos em PBT. Os anticorpos e diluições utilizadas foram as seguintes: *mouse* e *rat* anti-Elav (1/100; Developmental Studies Hybridoma Bank - DSHB), *mouse* anti-Cut 1/20 (DSHB), *guinea pig* anti-Runt (1/200; oferta de P. Gergen), *mouse* anti-Rh-1 (1/20; DSHB), *rabbit* anti-GFP (1/500; Molecular Probes). Utilizaram-se os

anticorpos secundários apropriados, conjugados com Cy5, Cy3 ou FITC (1/400; Jackson Immuno Research). Toto-3 (1/100; Invitrogen) foi utilizado na marcação do núcleo e faloidina-rodamina (1/200; Sigma) foi usada para marcar o citosqueleto de actina.

A montagem das amostras foi feita em glicerol 70%. Na montagem dos olhos de pupa e adultos, fez-se uma ponte formada por 3 lamelas, a fim de evitar o esmagamento das amostras.

As preparações foram observadas num microscópio confocal invertido Zeiss LSM 510 Meta. As imagens foram adquiridas com o *software* Zeiss SP 2 versão 4.0 e processadas em Adobe Photoshop.

2.2.5 Técnica de imersão

Para analisar o fenótipo do *knock-out* de *Ire1* por RNAi, fez-se o *imaging in vivo* da expressão de *Rh1-Gal4 > uasGFP^{ninaC}* no olho. As moscas foram previamente anestesiadas com CO₂, imobilizadas em agar 1% (em água) e submersas em água como descrito por Pichaud e Desplan^[66]. As imagens foram captadas com uma objectiva de *dipping* (Leica HCX APO 40x/0.80) num microscópio Leica (Macrofluor) equipado com *software* Leica LAS Montage.

2.3 Técnicas de Biologia Molecular

As técnicas moleculares utilizadas foram baseadas nos protocolos de Sambrook e colegas^[67]. Produtos comerciais e *kits* foram utilizados de acordo com as indicações do fabricante.

2.3.1 Electroforese em gel de agarose

As amostras de DNA foram carregadas em géis de 0,8% de agarose SeaKem LE (Lonza) contendo SYBR Green 1X (Invitrogen) e corridas em tampão TAE (Tris-acetato 0,04M, EDTA 0,001M; Lonza). O tamanho dos fragmentos de DNA foi estimado por comparação com as bandas do marcador molecular *Quick-Load 1kb* (BioLabs).

2.3.2 Extração de DNA de gel de agarose

Sempre que as bandas se destinavam ser extraídas, o gel de electroforese foi preparado numa concentração de 1% de agarose SeaKem GTG (Lonza). O DNA foi extraído do gel e purificado usando o *kit QIAquick Gel Extraction* (Qiagen).

2.3.3 Reacções de restrição, desfosforilação e ligação

As reacções de restrição foram incubadas a noite a 37°C. As enzimas de restrição utilizadas – *Bgl*II, *Bgl*III, *Acc*65I e *Xho*I – foram adquiridas à New England BioLabs.

Para impedir a recircularização de *pUAST*, este vector foi desfosforilado com fosfatase alcalina CIP (*Calf Intestinal Alkaline Phosphatase* da New England BioLabs) durante 15 min a 37°C. Para separar o vector *pUAST* da CIP, efectuou-se uma extracção fenólica de DNA.

As reacções de ligação foram realizadas utilizando a ligase T4 de DNA (New England Biolabs) e incubadas durante a noite a 18°C. Usou-se uma razão de inserto para vector nunca inferior a 3:1 (em µg).

2.3.4 Extracção fenólica de DNA

Juntaram-se volumes iguais da mistura com DNA a purificar e da solução fenol:clorofórmio:álcool isoamílico 25:24:1 (Sigma). Centrifugou-se à velocidade máxima durante 5 min e transferiu-se a fase aquosa para um novo *eppendorf*.

2.3.5 Transformação de células competentes

A estirpe *E. coli* 10G (Lucigen) foi utilizada nas transformações.

Adicionou-se a mistura de ligação ou o DNA plasmídico a 100µl de células competentes. Após 30 min de incubação em gelo, as células foram sujeitas a um choque térmico de 1min e 30s a 42°C. Colocaram-se as células em gelo durante 1-2 min e adicionaram-se 800µl de meio LB. Incubaram-se a 37°C com agitação constante durante 1h e 30 min e plaqueou-se em meio LA suplementado com 100µg/ml de ampicilina.

2.3.6 Purificação de DNA plasmídico

Na purificação de DNA plasmídico em pequena escala, utilizou-se o kit *QIAprep Spin Miniprep* (Qiagen). Para purificação em larga escala, usou-se o kit *HiSpeed Plasmid Midi* (Qiagen).

2.3.7 Clonagem do cDNA de *Ire1* em *pUAST*

O cDNA de *Ire1* obtido por RT-PCR foi clonado no vector intermediário *pJET* (**Anexo Fig.1A**), utilizando o kit *Clone JET PCR Cloning* (Fermentas). As extremidades do cDNA de *Ire1* foram preenchidas pela *DNA Blunting Enzyme* deste *kit* e posteriormente o cDNA de *Ire1* com extremidades cegas foi clonado de modo não dirigido em *pJET*, por intermédio da ligase T4 do *kit*.

O cDNA de *Ire1* foi separado de *pJET-Ire1* por digestão com a enzima de restrição *BglII* e posterior purificação da banda em gel. O cDNA de *Ire1* foi depois clonado de forma não dirigida no local *BglII* de *pUAST*. Para determinar a orientação do fragmento *Ire1* no vector *pUAST* (**Anexo Fig.1B**), foi feita uma digestão com a enzima *Acc65I* e respectiva análise de restrição. O plasmídeo *pUAST-Ire1* foi purificado em gel pelo *kit QIAquick Gel Extraction*

(Qiagen) e sequenciado (Stabvida). A lista de oligonucleótidos utilizados na sequenciação encontra-se na **Tab.2 do Anexo**.

3. Resultados e Discussão

3.1 Mapeamento espacial e temporal da activação da sinalização mediada por Ire1 e Xbp1 durante o desenvolvimento do olho

Utilizando o repórter *Xbp1-EGFP*, investigámos quais as fases do desenvolvimento de *Drosophila* durante as quais ocorre activação da via mediada por Ire1 e Xbp1 no olho. O repórter *Xbp1-EGFP* marca especificamente o núcleo das células nas quais a sinalização Ire1/Xbp1 está activada devido a stress no RE (**Anexo Fig. 2**).

Verificámos que a sinalização Ire1/Xbp1 é activada nos fotoreceptores desde as 48h de desenvolvimento na pupa até à idade adulta, durante fases críticas da morfogénese do rabdómero (**Fig. 6**). Esta activação da sinalização Ire1/Xbp1 ocorre na ausência de drogas indutoras de stress no RE e presumivelmente é causada pela activação endógena da sinalização de Ire1/Xbp1 durante a diferenciação dos fotoreceptores na pupa.

Durante a fase larvar, não há expressão de *Xbp1-EGFP* nas células dos discos imaginais do olho (**Fig. 6A**). Às 48h de desenvolvimento na pupa, *Xbp1-EGFP* começa a ser expresso nas células fotoreceptoras (**Fig. 6B**). Na pupa com 72h, praticamente todos os fotoreceptores expressam *Xbp1-EGFP* (**Fig. 6C**). Em adulto, a expressão de *Xbp1-EGFP* persiste em alguns fotoreceptores (**Fig. 6D**).

No adulto, ocorre activação de *Xbp1-EGFP* em *foci* negativos para Elav, marcador nuclear dos fotoreceptores (**Fig. 6D**). Atendendo à posição relativa destes *foci* de *Xbp1-EGFP* na secção horizontal do olho e ao facto de serem negativos para Elav, pensámos corresponderem à activação de *Xbp1-EGFP* em células cone. Cada omatídeo possui 4 células cone, as quais apresentam o núcleo numa posição mais próxima da superfície exterior do olho, “acima” dos fotoreceptores nas secções horizontais. As células cone segregam o material que forma a lente^[68]. Para testar a possibilidade de *Xbp1-EGFP* ser activado nas células cone, fizemos uma imunomarcacção com anti-Cut (marcador específico dos núcleos de células cone).

Verificámos que a expressão de EGFP do repórter não sobrepõe com a marcação anti-Cut, mas muitas vezes localiza-se numa posição imediatamente proximal relativamente aos núcleos de células cone e distal relativamente aos fotoreceptores. É possível que estes *foci* de marcação de *Xbp1-EGFP* correspondam a proteína que permanece em processo de degradação pelo proteossoma, depois de ter estado activa nos fotoreceptores da pupa.

Em alternativa, estes *foci* de marcação de Xbp1-EGFP podem corresponder a células do pigmento. As células do pigmento acumulam grânulos de pigmentos e rodeiam os cones e os fotorreceptores, formando uma estrutura com a forma de favos de uma colmeia^[7]. Para confirmar que se tratam de células do pigmento será necessário fazer uma marcação com o anticorpo primário anti-*Homothorax*, marcador de células do pigmento.

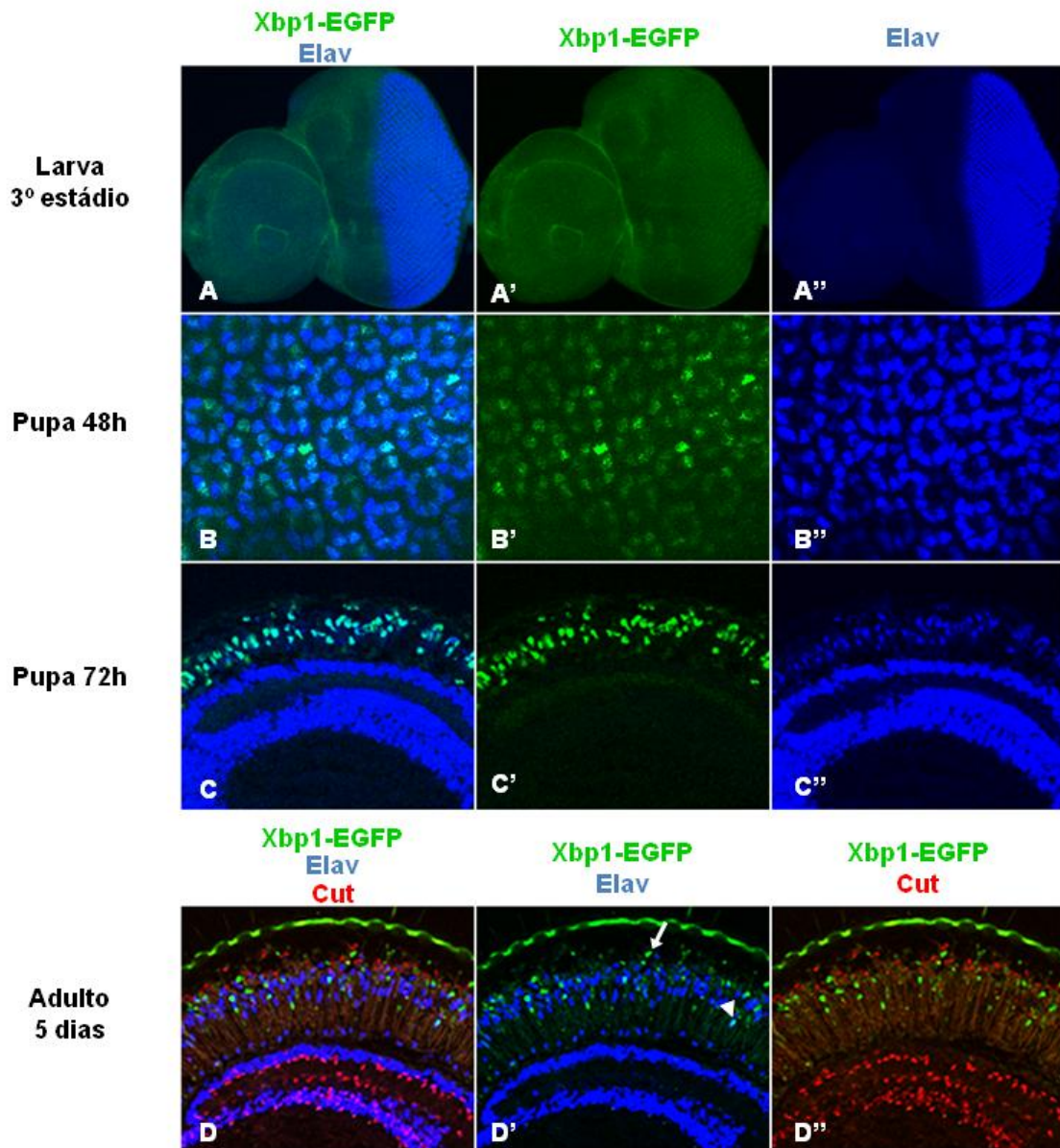


Figura 6. Expressão de Xbp1-EGFP na larva (A), pupa (B e C) e adulto (D). A sinalização mediada por Ire1 e Xbp1 é activada nos fotorreceptores desde a pupa de 48h até à idade adulta. A expressão de Xbp1-EGFP está em verde e os fotorreceptores marcados por Elav estão em azul. (A) Não há expressão de Xbp1-EGFP nos discos imaginais do olho de larva do 3º estágio. (B) Na pupa de 48h, inicia-se a expressão de Xbp1-EGFP nos fotorreceptores. (C) Na pupa de 72h, praticamente todos os fotorreceptores expressam Xbp1-EGFP. (D) As células cone estão marcadas por Cut em vermelho. No adulto de 5 dias, Xbp1-EGFP é expresso em fotorreceptores (cabeça de seta) e noutro tipo celular ainda não identificado (seta). (C) e (D) são secções horizontais do olho.

3.2 Análise de clones de *ire1*^{f02170} no olho

Para determinar qual a importância de *ire1* na diferenciação dos fotoreceptores, observámos o desenvolvimento de olhos com clones *ire1*^{f02170} *-/-*. A mutação *ire1*^{f02170} é causada pela inserção de um elemento do tipo *PiggyBac*{*WH*} na região codificante de *ire1*, levando à disrupção do gene (**Fig. 11A**). Em clones *ire1*^{f02170} *-/-*, surgem alterações graves na morfologia dos fotoreceptores com alteração do tamanho, forma e organização dos rabdómeros e perturbações na síntese/transporte de proteínas destinadas ao rabdómero (**Fig. 7**).

Nos discos imaginais da larva, não existem alterações fenotípicas no desenvolvimento dos clones mutantes *ire1*^{f02170} *-/-* (**Fig. 7A**). O recrutamento dos fotoreceptores mutantes ocorre normalmente, sendo cada *cluster* da região mais posterior do disco do olho constituído por 8 células positivas para Elav. Nestes *clusters* mais velhos, duas das células positivas para Elav são também marcadas por Runt (específico dos fotoreceptores R7 e R8). Tendo em conta que R8 e R7 são respectivamente o primeiro e o último fotoreceptores a serem recrutados e que para a especificação dos últimos (R1, R6 e R7) é necessária a especificação dos primeiros (R8, R2 e R5, R3 e R4), concluímos que a especificação dos fotoreceptores na larva não foi perturbada pela mutação *ire1*^{f02170}.

Às 48h de desenvolvimento na pupa, é visível o espessamento do citosqueleto actínico, por marcação com faloidina, na extremidade apical dos fotoreceptores, onde se vai formar o rabdómero (**Fig. 7B**). Também neste caso não observamos alterações significativas nos fotoreceptores e rabdómeros dos clones mutantes *ire1*^{f02170} *-/-*. *Ire1* não deverá ser necessária para a polimerização ou modelação da actina do rabdómero nestas fases da morfogénese. Para esta fase de desenvolvimento, utilizámos ainda marcadores de proteínas que são transportadas para a membrana apical, como *Crumbs* e *Armadillo*, mas os resultados não foram esclarecedores.

Às 72h de desenvolvimento na pupa, os fotoreceptores dos clones *ire1*^{f02170} *-/-* apresentam uma morfologia radicalmente alterada relativamente a tecido controlo: os rabdómeros surgem atrofiados, com uma secção tangencial irregular e o espaço inter-rabdomérico é reduzido (**Fig. 7C**).

Imagens de microscopia electrónica de olhos de adulto, nos quais todo o olho é um único clone *ire1*^{f02170} *-/-*, mostram alterações na ultraestrutura dos rabdómeros semelhantes àquelas observadas às 72h de desenvolvimento na pupa (**Anexo Fig. 3A**, cedida por Pedro Domingos). A excisão precisa do *PBac*{*WH*} de *ire1*^{f02170} reverte o fenótipo, com os rabdómeros a apresentarem a morfologia característica (**Anexo Fig. 3B**, cedida por Pedro Domingos).

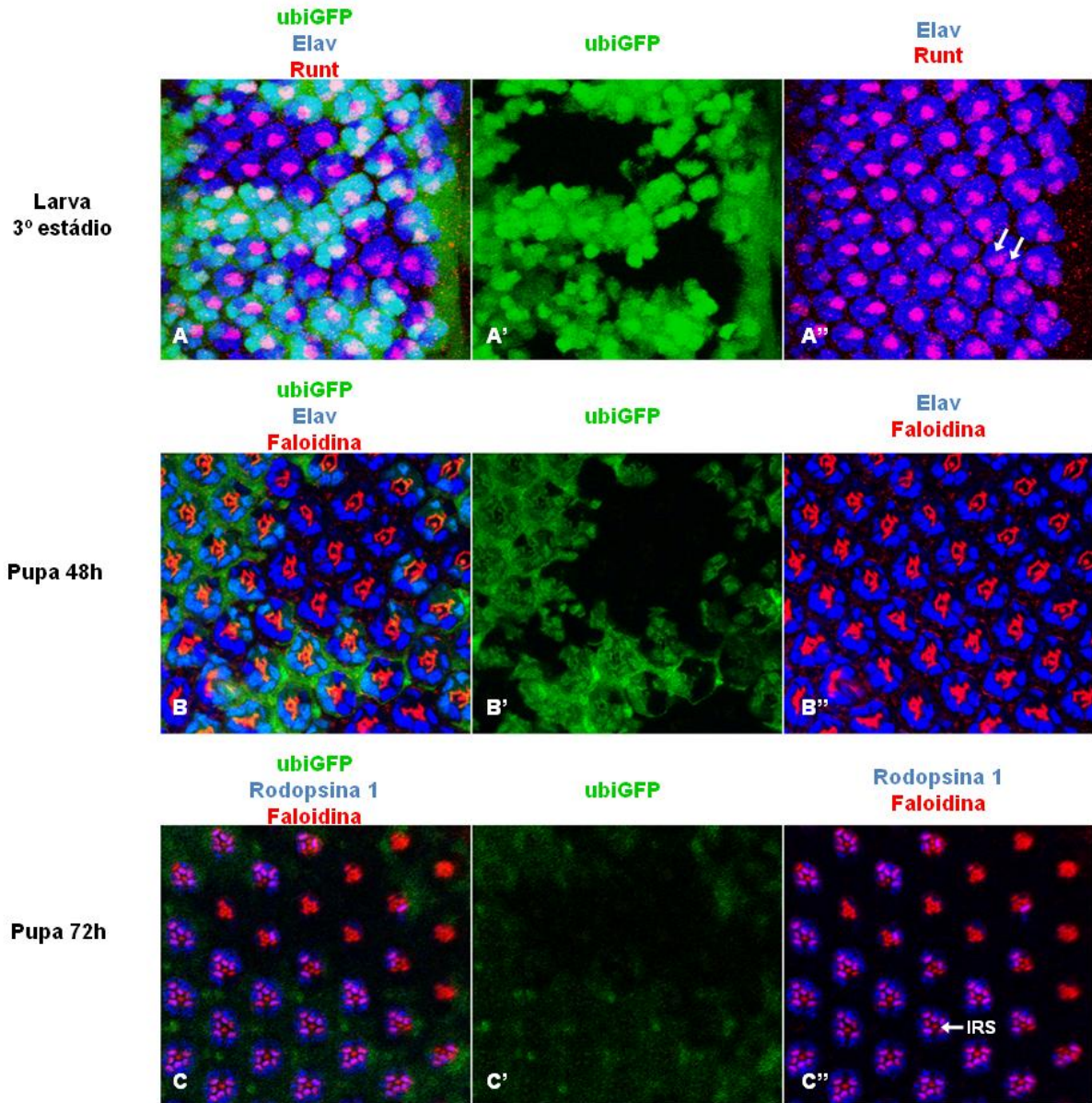


Figura.7 Clones de *ire1^{f02170}* em discos imaginais do olho de larva (A) e em olhos de pupa de 48h (B) e de 72h (C). Os clones *ire1^{f02170}* estão marcados pela ausência de ubiGFP (em verde). (A) A mutação *ire1^{f02170}* não interfere com o recrutamento/especificação dos fotoreceptores. Na região posterior do disco imaginal do olho, cada cluster é constituído por 8 células, duas das quais correspondem a R7 e R8 (setas). Os fotoreceptores estão marcados por Elav (em azul), R7 e R8 estão também marcados por Runt (em vermelho). (B) A mutação *ire1^{f02170}* não interfere com a modelação do citoesqueleto actínico do rabdomero numa fase precoce da morfogénese. Os fotoreceptores estão marcados por Elav (em azul) e a actina está marcada por faloidina (em vermelho). (C) Às 72h de desenvolvimento na pupa, os rabdomeros mostram graves deficiências estruturais nos clones *ire1^{f02170}*-. Pequenos rabdomeros de forma irregular contactam entre si devido à redução do espaço inter-rabdomérico (IRS).

O transporte de Rodopsina 1 do RE para o rabdomero começa na extremidade proximal do fotoreceptor (junto ao lobo óptico do cérebro) e vai-se estendendo até à extremidade distal (junto da superfície do olho)^[69]. Às 72h de desenvolvimento na pupa, observa-se uma maior quantidade de Rodopsina 1 na extremidade proximal dos fotoreceptores (**Fig. 8AB**). Nos fotoreceptores *ire1^{f02170}*-, a quantidade de Rodopsina visível é reduzida

comparativamente aos fotoreceptores não mutantes (**Fig. 8AB**). Mais, não existe sobreposição entre a marcação da actina e a marcação de Rodopsina 1, ou seja, a Rodopsina 1 não é transportada até ao rabdómero e acumula-se no corpo celular dos fotoreceptores *ire1^{f02170}*^{-/-} (**Fig. 8CD**). Será interessante determinar futuramente se a Rodopsina 1 se acumula no RE ou fica retida no Golgi ou em vesículas no citoplasma.

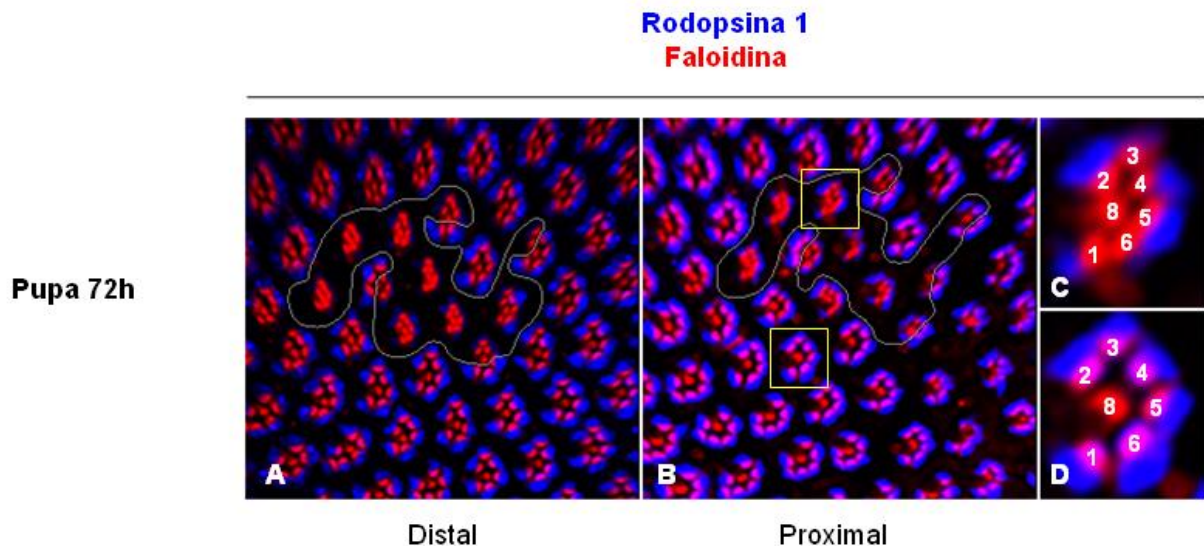


Figura 8. Clones de *ire1^{f02170}* num plano distal (A) e num plano proximal (B) do olho às 72h de desenvolvimento na pupa. (C) e (D) são pormenores de (B). Os clones *ire1^{f02170}*^{-/-} estão delimitados pela linha a branco. A Rodopsina 1 está em azul e a actina marcada por faloidina está em vermelho. (A, B) A quantidade de Rodopsina 1 presente no plano distal do olho é menor que a quantidade presente no plano proximal. (C, D) Nos fotoreceptores *ire1^{f02170}*^{-/-} (C), a quantidade de Rodopsina 1 visível é reduzida, comparativamente a fotoreceptores não mutantes (D). Nos fotoreceptores mutantes, a Rodopsina 1 não é transportada para o rabdómero (não há sobreposição entre a marcação azul da Rodopsina e a marcação vermelha da actina).

Temos 3 hipóteses explicativas para a reduzida quantidade de Rodopsina 1 em clones *ire1^{f02170}*^{-/-}. A primeira hipótese é que Ire1 estimula a biogénese de Rodopsina 1, durante a morfogénese do rabdómero. Ire1 activada torna Xbp1 um factor de transcrição funcional e este, por sua vez, promove a transcrição, directamente ou indirectamente, de genes-alvo que eventualmente participam na biogénese de Rodopsina 1, como, por exemplo, chaperones do RE.

A segunda hipótese é que Ire1 pode ser, de alguma forma, necessária para a transcrição de Rodopsina 1 (*ninaE*). Para testar esta hipótese, estamos a fazer cruzamentos genéticos para analisar os níveis de expressão de Rh1-LacZ (repórter de transcrição de Rodopsina 1).

A terceira hipótese está relacionada com o facto de utilizarmos o anticorpo monoclonal 4C5 para detectarmos Rodopsina 1. É possível que este anticorpo reconheça um antigénio que apenas está presente na forma correcta de *folding* de Rodopsina 1. Assim sendo, e presumindo que a função de Ire1 é necessária para o *folding* desta proteína, os níveis de

Rodopsina 1 com *folding* correcto estarão reduzidos relativamente ao tecido controlo, mesmo que os níveis totais da proteína e do transcrito sejam semelhantes entre os dois tecidos. Esta hipótese poderá eventualmente ser clarificada com a utilização de um anticorpo poli-clonal contra Rodopsina 1, que reconheça vários antígenos nesta proteína.

A Rodopsina 1, para além de estar envolvida na captação de estímulos visuais, é essencial na morfogénese do rabdómero. Em mutantes nulos de *ninaE*, a estrutura do rabdómero é instável e apresenta defeitos dramáticos mesmo antes da eclosão, com a membrana do rabdómero a invadir o corpo celular do fotoreceptor^[69,70,71]. Outras proteínas como *Crumbs* e *Discs lost* têm também um papel fundamental na morfogénese do rabdómero^[10,11,12]. A mutação *ire1^{f02170}* interfere com o tamanho e morfologia do rabdómero pois, provavelmente, as proteínas estruturais do rabdómero e que regulam a sua formação não são eficazmente sintetizadas e transportadas até à membrana apical, acumulando-se ao longo do percurso RE-Golgi-rabdómero.

Nos clones mutantes *ire1^{f02170}* *-/-*, o espaço inter-rabdomérico que separa os rabdómeros do mesmo omatídeo é quase inexistente, levando a que os rabdómeros fiquem quase em contacto entre si (**Fig. 7C**). Este tipo de arquitectura “fechada” do olho, na qual não existe um espaço inter-rabdomérico é típica de alguns insectos como abelhas e mosquitos, e difere da arquitectura “aberta” do olho da mosca da fruta e da mosca doméstica, na qual os rabdómeros estão bem separados entre si. A formação da arquitectura “aberta” é dependente da secreção de uma proteína extracelular, *Spacemaker* (Spam), em conjunto com a acção de outras moléculas de adesão celular^[72]. À luz dos nossos resultados, é possível especular que Spam e possivelmente outras proteínas que se destinam ao espaço extracelular não estão a ser secretadas normalmente nos clones mutantes de *Ire1*, o que explicaria o desaparecimento do espaço inter-rabdomérico. Neste caso, e à semelhança do que acontece com as proteínas membranares, a síntese/transporte de proteínas destinadas ao espaço extracelular parece ser pouco eficaz em mutantes *ire1^{f02170}*.

A activação das vias que constituem o mecanismo de UPR tem uma função adaptativa, permitindo à célula responder eficazmente às variações na quantidade de proteínas produzidas no RE durante o desenvolvimento. Particularmente, em células secretoras, o mecanismo de UPR contribui para a biogénese das membranas do RE e aumenta a capacidade destas células em processar e promover o *folding* das proteínas a secretar^[73]. A activação da sinalização Xbp1/*Ire1* foi já observada em plasmócitos produtores de anticorpos no ratinho e em glândulas salivares de larvas do 3º estágio na *Drosophila*^[74,75]. Durante a morfogénese do rabdómero, uma grande quantidade de proteínas tem de ser sintetizada no RE e transportada ao longo de toda a via secretora até à membrana apical em diferenciação, onde se localiza o rabdómero. Uma mutação em *Ire1* compromete a capacidade de resposta da célula a uma intensa síntese proteica, daí que as proteínas como

futuro fazer os controlos adequados para garantir que o fenótipo observado não se deve a um eventual efeito de *off-target*.

Para complementar estas experiências de *knock-down* de *ire1*, já construímos moscas para testar os efeitos do aumento das cópias do driver *rh1-Gal4*, da expressão precoce de RNAi (sob controlo do driver *GMR-Gal4*), da expressão de RNAi em clones do olho e com co-expressão de Dicer-2, que permite um aumento da eficiência dos RNAs em neurónios. Porém estas moscas ainda não foram analisadas.

3.4 Efeito da mutação *xbp1*^{k13803} na morfologia dos fotoreceptores

O meu orientador verificou que fotoreceptores homozigóticos para a mutação *xbp1*^{k13803} não apresentam deficiências na diferenciação e morfologia do rabdómero (**Anexo Fig. 4**). Esta observação não está de acordo com a activação de Xbp1-EGFP na pupa durante a morfogénese do rabdómero, descrita acima.

A mutação *xbp1*^{k13803} é causada pela inserção de um *P{lacW}* na região 5' não codificante de *xbp1*, sendo provavelmente uma mutação hipomórfica (**Fig. 10**). Consistente com esta ideia, larvas homozigóticas para *xbp1*^{k13803} mantêm uma expressão residual do mRNA de *xbp1*^[53]. Talvez exista uma fracção da actividade normal de Xbp1 no alelo *xbp1*^{k13803} e esta actividade seja suficiente para manter a normal diferenciação dos fotoreceptores.

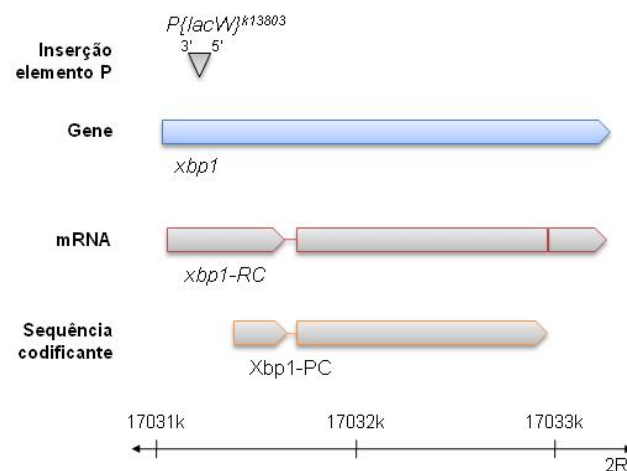


Figura.10 Extensão do gene *xbp1* no braço direito do segundo cromossoma (2R). O mRNA e a sequência codificante de *xbp1* estão representados à escala. O local de inserção do elemento *P{lacW}*^{k13803} situa-se na região 5'UTR do gene. Os intrões correspondem às linhas horizontais finas. (Adaptado da Flybase)

Alternativamente, é possível que Xbp1 não seja necessário para o normal desenvolvimento do olho e diferenciação dos fotoreceptores. Neste caso, Ire1 será necessário na diferenciação dos fotoreceptores e Xbp1 não, apesar de ambas as proteínas fazerem parte da mesma via de sinalização. Isto pode ser explicado, se considerarmos que

esta via de sinalização não é linear como até há pouco tempo se pensava, uma vez que Ire1 actua sobre outros alvos para além de Xbp1. Recentemente foi demonstrado que Ire1 tem uma função no UPR independente de Xbp1, levando à degradação de vários mRNAs codificando proteínas-cliente do RE^[52]. O mecanismo pelo qual ocorre a degradação dos mRNAs ainda não foi esclarecido, podendo estar dependente da actividade de endoribonuclease de Ire1 ou ocorrendo através da activação de outras nucleases a jusante de Ire1.

Concluindo, para determinar qual o papel de Xbp1 na diferenciação dos fotoreceptores, a mutação *xbp1*^{k13803} que foi utilizada não é o reagente ideal, sendo necessário gerar um alelo onde, garantidamente, toda a actividade de Xbp1 esteja ausente: um alelo nulo de *xbp1*.

3.5 Excisão imprecisa de *P{lacW}*^{k13803}

Com o objectivo de obter uma mutação nula de *xbp1*, induzimos a mobilização de *P{lacW}* gerando moscas com o gene da transposase *PIT*^{Δ2-3} e a inserção de *P{lacW}*^{k13808} (**Anexo** para cruzamentos genético). Nesta combinação genética, a transposase provoca a excisão de *P{lacW}*^{k13808} que, em aproximadamente 10% dos casos, ocorre de forma imprecisa^[76]. Uma eventual excisão imprecisa de *P{lacW}*^{k13808} pode provocar a deleção de parte da sequência codificante de *xbp1*.

As moscas com o gene da transposase *PIT*^{Δ2-3} e a inserção de *P{lacW}*^{k13808} produzem gâmetas com excisões de *P{lacW}*^{k13808}, pois a transposase está activa nas células somáticas e na linha germinal. Para seleccionar a descendência formada a partir de gâmetas com excisões, seleccionaram-se as moscas que perderam a coloração laranja do olho, que era proveniente do gene *mini-w*⁺ presente em *P{lacW}*.

Gerámos 130 excisões diferentes que foram individualmente testadas para letalidade ou complementaridade com a mutação *xbp1*^{k13803}. Das 130 excisões obtidas, 5 não complementaram a mutação *xbp1*^{k13803} (não foram obtidos do cruzamento organismos *Exc.xbp1*^{k13803}/*xbp1*^{k13803} - tabela 1). Dado que *xbp1*^{k13803} é uma inserção letal, estas 5 excisões foram consideradas candidatas a mutações nulas em *xbp1*.

A fim de analisar a sequência genômica de *xbp1* nestas 5 excisões, rastreou-se por PCR as regiões adjacentes ao local de inserção de $P\{lacW\}^{k13808}$. Testaram-se várias combinações de oligonucleótidos com diferentes sequências-alvo na região codificante de *xbp1*, nas UTRs de *xbp1* e nos genes imediatamente a montante e a jusante de *xbp1*, bem como na extremidade 5' de $P\{lacW\}$ (**Fig. 11A**).

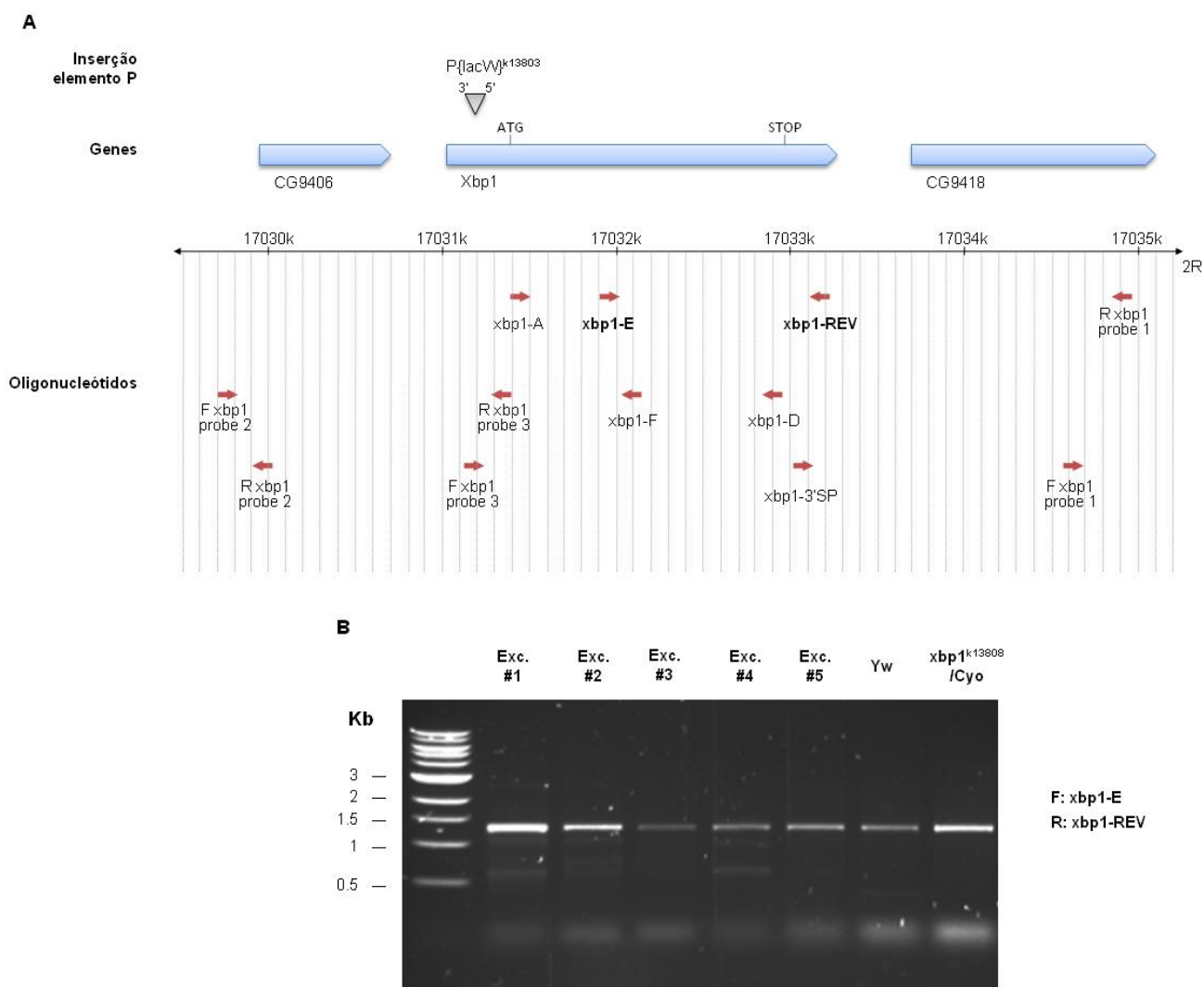


Figura 11. Estratégia de PCR utilizada para determinar o resultado das excisão de $P\{lacW\}^{k13808}$ na região genômica de *xbp1*. (A) Oligonucleótidos utilizados nas reacções de PCR e respectivas sequência-alvo. (B) Produtos de amplificação de uma reacção de PCR, utilizando os oligonucleótidos *xbp1*-E e *xbp1*-REV. Exc.#1-Exc.#5: excisões imprecisas de $P\{lacW\}^{k13808}$ obtidas. yw: controle positivo. $xbp1^{k13808}/Cyo$: linha original de inserção de $P\{lacW\}^{k13808}$ em *xbp1*.

Utilizando o par de oligonucleótidos *xbp1*-E e *xbp1*-REV, obteve-se um produto de amplificação com cerca de 1.3Kb correspondente ao tamanho da sequência genômica intacta (**Fig. 11B**). Outras reacções de PCR nas quais se utilizaram outros pares de oligonucleótidos tiveram o mesmo tipo de resultado, incluindo produtos de amplificação

obtidos a partir de oligonucleótidos na extremidade 5' de $P\{lacW\}$. Nenhuma das excisões seleccionadas constitui uma deleção parcial ou total da ORF de *xbp1*.

Estes resultados podem ser explicados se parte de $P\{lacW\}^{k13808}$ tiver permanecido em *xbp1* e a restante parte contendo o gene *mini-w*⁺ tiver sido excisada. A parte de $P\{lacW\}^{k13808}$ que supostamente permanece em *xbp1* não altera a sequência codificante mas diminui drasticamente os níveis de expressão do gene. Embora estas 5 excisões sejam imprecisas e letais, não são deleções da sequência de *xbp1*.

Uma forma de alternativa de lidar com esta situação no futuro será seleccionar todas as excisões de $P\{lacW\}^{k13808}$, letais e não letais. Neste caso, será necessário rastrear por PCR as consequências a nível da sequência genómica de *xbp1* para todas as excisões.

3.6 Clonagem de Ire1

Apesar de termos observado alterações na morfologia dos fotoreceptores na mutação nula de *ire1* (*ire1*^{f02170}) e com o reagente de RNAi (*ire1*^{GD3071}), evidenciando que Ire1 é necessário durante a diferenciação de fotoreceptores, ainda temos de provar que a expressão de Ire1 é suficiente para recuperar o fenótipo normal nestes mutantes. Assim, planeámos utilizar uma construção na qual a ORF de *ire1* está sob o controlo de sequências uas para fazer o *rescue* do fenótipo de mutantes de *ire1*. Como *ire1* ainda não estava clonado, fizemos a síntese de cDNA de *ire1* e clonámo-lo no vector de expressão em *Drosophila*, pUAST.

De acordo com a *FlyBase*, Ire1 tem duas isoformas: Ire1-PB e Ire-PC, as quais diferem na região N-terminal e na extensão da proteína: PB tem 1074 aminoácidos e PC tem 962 aminoácidos (**Fig. 12**). A isoforma Ire1-PB é a mais conservada comparativamente a

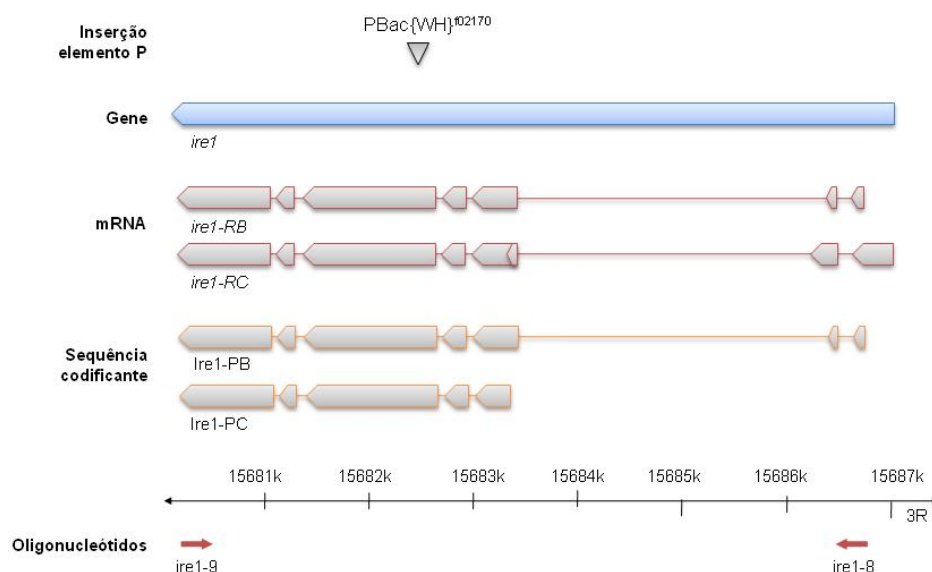


Figura 12. Extensão do gene *ire1* no braço direito do terceiro cromossoma (3R). Podem ser produzidos dois transcritos a partir de *ire1*, que originam 2 isoformas da mesma proteína: Ire1-PB e Ire1-PC. O elemento $PBac\{WH\}^{f02170}$ está inserido na sequência codificante de *ire1*. Estão representados também os locais onde os oligonucleótidos *ire1-8* e *ire1-9* hibridam. Os intrões correspondem às linhas horizontais finas. (Adaptado da *FlyBase*)

mamíferos (resultados não mostrados).

O cDNA de *ire1* foi obtido por RT-PCR de RNA total preparado a partir de tecidos de larva, utilizando oligonucleótidos específicos para a isoforma Ire1-RB (**Fig. 13A**). O cDNA de *ire1* foi clonado na forma linear do plasmídeo pJET e posteriormente subclonado no local *Bgl*II de pUAST (**Fig. 13B,C,D**).

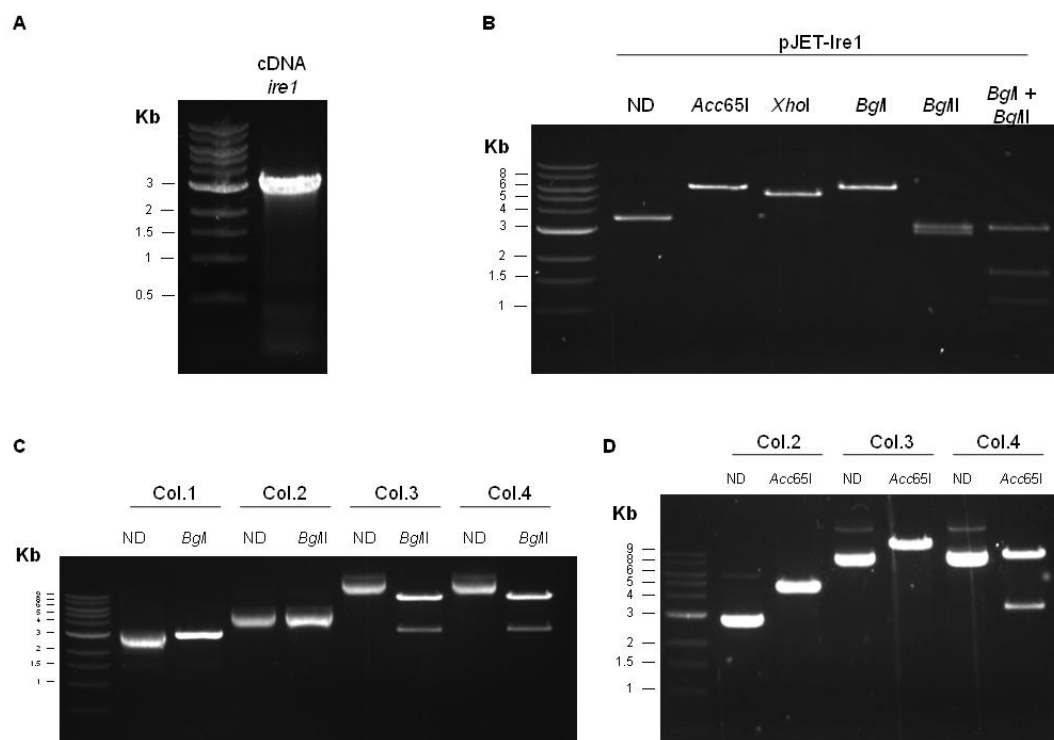


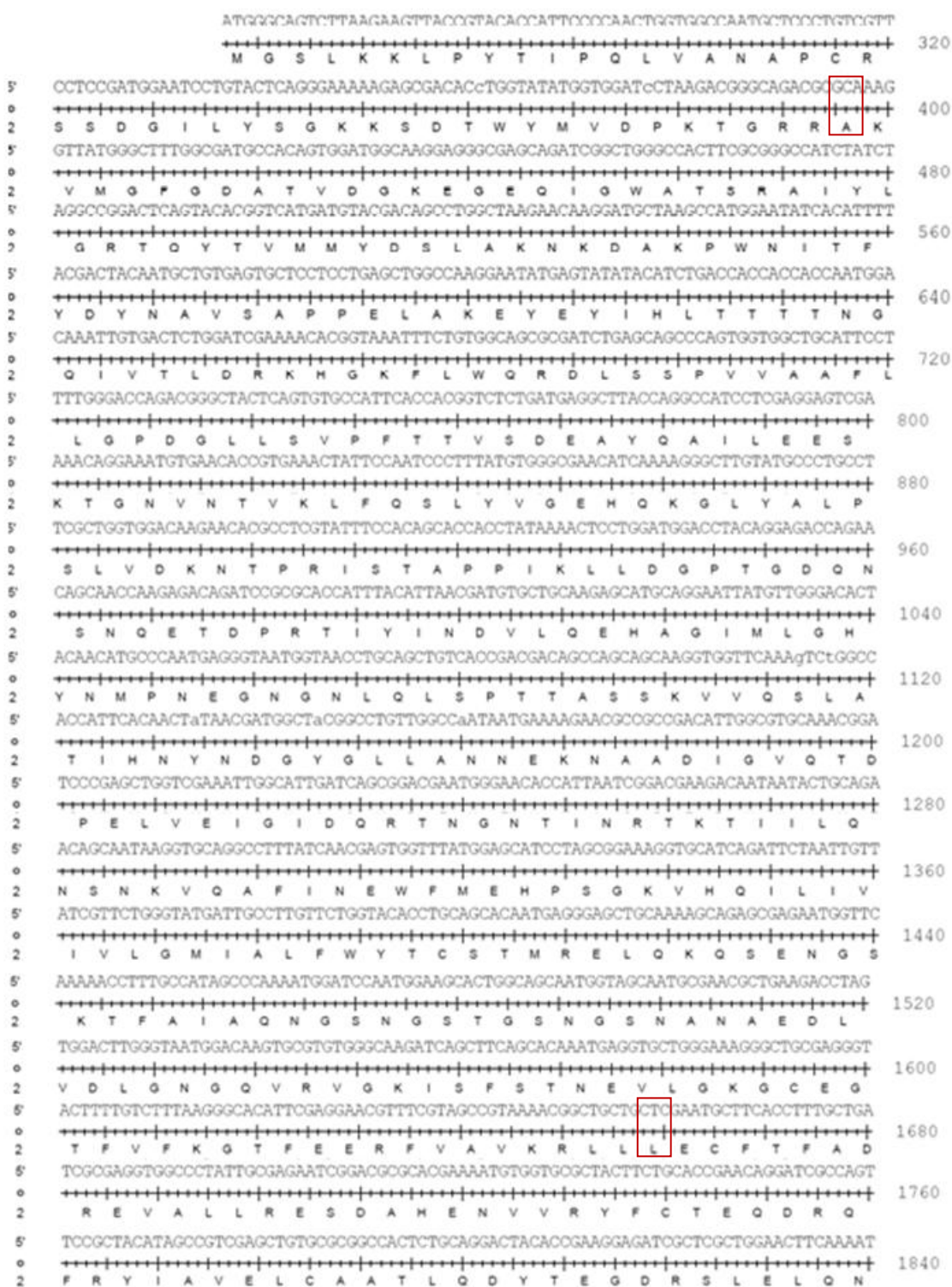
Figura 13. Obtenção de pUAST-Ire1. (A) cDNA de *ire1* obtido por RT-PCR de RNA total extraído de larvas do 3ºestádio, utilizando os oligonucleótidos ire1-8 e ire1-9. (B) Digestão do cDNA de *ire1* clonado em pJET (pJET-Ire1) com as enzimas de restrição *Acc65I*, *XhoI*, *BglI*, *BglII* ou *BglI* e *BglII* (C) Digestão com a enzima *BglII* de DNA plasmídico preparado a partir de quatro colônias de bactérias transformadas com a mistura de ligação pUAST-Ire1. Apenas as colônias 3 e 4 foram transformadas pelo plasmídeo ligado ao inserto (pUAST-Ire1). (D) Digestão do DNA plasmídico das colônias transformantes com *Acc65I* para determinar a orientação do inserto. A colônia que apresenta o inserto na orientação correcta é a 3. ND: não digerido.

A sequenciação de pUAST-Ire1 revelou que o cDNA de Ire1 tem na sua extremidade N-terminal o codão 1 da isoforma Ire-PB, seguido do exão 3 com um codão *stop* prematuro introduzido por um *frameshift* causado pela ausência do exão 2. Após o *stop* do exão 3 de Ire1-PB, a sequência clonada tem a grelha de leitura completa da isoforma Ire1-PC.

Na sequência clonada de Ire1-PC, existem 4 substituições não sinónimas: GCA em vez de GAA (A por E na posição 47), CTC em vez de CCC (L em vez de P na posição 468), TCT em vez de TTT (S em vez de F na posição 926), e AGC em vez de ATC (S em vez de I na posição 953) (**Fig. 14**). Nenhuma destas substituições ocorre num resíduo que seja conservado em comparação com humano, ratinho, *C.elegans* ou levedura. Por isso, estas substituições podem tratar-se de polimorfismos, o que terá de ser confirmado por

sequenciação de cDNA de Ire1 obtido a partir de uma segunda amplificação por RT-PCR a partir do mesmo RNA total.

Gen Joseph, do laboratório do Prof. Hermann Steller (Universidade de Rockefeller), em comunicação pessoal, compartilhou connosco que em reacções de RT-PCR em que utilizou *primers* específicos para a isoforma PB ou PC, apenas obteve produto de amplificação para a isoforma PC. Pensamos que a isoforma Ire1-PB descrita na *FlyBase* não exista nas células de onde extraímos o RNA total e que o cDNA clonado corresponda também à forma Ire1-PC.




```

5' CACATCGATGTTTGGCAAGTGTGAGCCAGGCTGCATCTGGACTTAGTCATCTTCACTCTCTCGACATTGTGCATCGOGA
0 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
2 H I D V W Q V L S Q A A S G L S H L H S L D I V H R D 1920
5' CATCAAGCCGCAAAATGTTCTTATTTGCTGCGCAGAGCCAGGGCAAAGTAAGTGTGATGATCTCCGATTTTGGGCTGT
0 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
2 I K P Q N V L I S L P D A K G K V R V M I S D F G L 2000
5' GCAAGAAGCTGAATTTTGGCAAGACTAGTTTCTCACGGGATCGGGGTGAACAGGCACCGATGGATGGATAGCCCCAGAA
0 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
2 C K K L N F G K T S F S R R S G V T G T D G W I A P E 2080
5' ATGATGAGATCACAGCGAAGACAAGTCTGCTGGATATATTTTCTTGGGCTGCGTTTATTATTATGTTTAAAGTGGGG
0 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
2 M M R S Q R T T T A V D I F S L G C V Y Y Y V L S G G 2160
5' TCACCAGGCTTTGGTGACAATCTGAAGCGACAGGCAACATCTCTCCAGAGTACAATCTGGCCAAAGCTGCGCCAG
0 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
2 H H A F G D N L K R Q A N I L S H E Y N L A K L R P 2240
5' AGGACGACAGTGGAGCAGCGAATTATCTTGTGCTGAGCAATTAATATCGGATATGATACACAAGGATCCGCAATCGOGA
0 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
2 E D D S E D S R I I L A E Q L I S D M I H K D P Q S R 2320
5' OCTCCAGCTCGTTGTATCGGAAATCATCGCTCTTTGGGATGAGCCTAAATGCTCTCGTTCTCCAGGATGTCAGOGA
0 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
2 P P A R C I G N H P L F W D E P K M L S F L Q D V S D 2400
5' TCGTGTGGAGAAGTTCGAATTCATGCGAGCGCTCAAGTGTGCTGGAGAAGAACGGGCGGATAGTCGTTTATAGCGATT
0 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
2 R V E K L Q F H A E P L K S L E K N G R I V V L D D 2480
5' GGAATGTCATCTGGAGCCCATGATCAAGGATGATTGAGGAAGTAACGCGGATATATGGGCGCAGTGTACGAGATTG
0 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
2 W N V H L D P M I T D D L R K Y R G Y M G A S V R D L 2560
5' CTCGCTGCTCTGOGTAAAGCAAGGATCATTATCAAGAGTTAAGCCAGCGCCAGAGATGCTGGGCTGCATTCCGCA
0 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
2 L R A L R N K K H H Y H E L T P A A Q K M L G C I P H 2640
5' CGAATTCAACCACTACTGGGTAGATCGCTTCCCGCAGCTCATTTCACAGCGCTAOCACGGGTTTCACTATTGCTCAATG
0 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
2 E F T N Y W V D R F P Q L I S H A Y H A F S I C S N 2720
5' AGCCGATCTTCAAGCGTACTACAGTGGCGCTATCTTTTACAGTCCGCTGCTACTTTGATGCGGAGATGCGCTGTTT
0 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
2 E P I F K P Y Y S A G Y L F T R P W Y F D A D D A L F 2800
5' CCCATGCTGATGCTGGATCCAAAGCCCTGCGCAAGATTGGTAGTCTAAAAGACACCTTCGCGGCAAGCAGCGCAAGC
0 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
2 P M L M L D P K P L P K I G S P K K T P S P A S S Q A 2880
5' TCAGCAGCTGAAGCAAAGAAAAGGCTCTACAACCTTTCGTAAGCCCAACGATGAGCTGCGGATTCTTGGCGTTGGTCTGC
0 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
2 Q Q L K Q R K G L Y N F R K P N D E L P I P G V G L 2960
5' AGCGTAATCTAGAGCTAGATGGACAATCACTGGAGCCGATGGCAAGCGGGATGTGTTTGTCTAACTTCAAGTCTGGGCGC
0 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
2 Q R N L E L D G Q S L E P D G K R D V F A N F K S R R 3040
5' TACTCGAAGCCGGGAAACAATCGCAATTACAACGGTGGGCAAGGAAGCGCAGGACAAGGAAAAGTACGTAGCTGGAC
0 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
2 Y S K P G N N R N Y N G G H K E A Q D K E K Y V S W T 3120
5' GCTGCCACCTTCAACGCAGGATTGA
0 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
2 L P P S T Q D

```

Figura 14. Sequenciação do cDNA de *ire1* clonado em pUAST. A sequência clonada apresenta 4 substituições não sinónimas: A em vez de E na posição 47 (GCA no lugar de GAA), L em vez de P na posição 468 (CTC em vez de CCC), S em vez de F na posição 926 (TCT em vez de TTT), e S em vez de I na posição 953 (AGC em vez de ATC). Os oligonucleótidos utilizados na sequenciação encontram-se em anexo.

4. Conclusão

A sinalização Ire1/Xbp1 é activada nos fotoreceptores durante a morfogénese do rabdómero, desde fases intermédias do desenvolvimento na pupa até à idade adulta. Esta via é ainda activada noutro tipo celular do olho ainda não identificado no adulto. Ire1 é necessária para a diferenciação dos fotoreceptores na pupa e mutações em Ire1 estão

associadas com alterações drásticas na morfogénese do rabdomero. Em mutantes *ire1*^{f02170}, os rabdomeros têm uma forma irregular, são atrofiados e o espaço inter-rabdomérico encontra-se praticamente ausente. Nestes mutantes, a Rodopsina 1 não é transportada até ao rabdomero em formação e acumula-se no corpo celular do fotoreceptor. Pensamos que outras proteínas estruturais e reguladoras do desenvolvimento do rabdomero e do espaço inter-rabdomérico (como Spam) falhem também em atingir o seu destino, o que explicaria os defeitos graves na arquitectura de fotoreceptores mutantes.

O papel de *xbp1* na diferenciação de fotoreceptores continua por esclarecer. Os dados disponíveis demonstram o *splicing* de Xbp1-EGFP nos fotoreceptores da pupa, mas também a ausência de alterações na morfologia do olho na mutação *xbp1*^{k13803}, ficando por esclarecer se *xbp1* tem uma função essencial ou não na morfogénese do rabdomero.

Pensamos que, nos tecidos donde extraímos RNA, apenas existe uma isoforma de Ire1, correspondente à sequência de Ire1-PC.

Estes resultados, em conjunto, levam-nos a colocar a hipótese de que o mecanismo de UPR, principalmente a via mediada por Ire1 e Xbp1, é activado durante a diferenciação dos fotoreceptores para aumentar a capacidade do RE em produzir vesículas com Rodopsina 1 e outras proteínas, que são direccionadas para o rabdomero em formação. No futuro, será interessante determinar qual o mecanismo pelo qual Ire1 e Xbp1 contribuem para a morfogénese do rabdomero. Pensamos que a sinalização Ire1/Xbp1 poderá activar a expressão de enzimas do RE e chaperones envolvidas na biogénese de proteínas do rabdomero.

Esperamos que este estudo acrescente ideias novas acerca do papel do mecanismo do UPR *in vivo* e da sua importância ao nível do organismo, usando um paradigma bem conhecido – o olho de *Drosophila*. Esperamos que estes resultados contribuam para a compreensão dos mecanismos complexos que causam Retinite Pigmentosa, tendo em conta que mutações que afectam a expressão ou transporte de Rodopsina 1 têm sido associados com degeneração da retina.

5. Bibliografia

- [1] Wolff, T., Ready, D., in *The Development of Drosophila melanogaster*. Cold Spring Harbor Lab. Press, Plainview, N.Y., 1993. p. 1277.
- [2] Ready, D. F., Hanson, T. E., Benzer, S., *Development of the Drosophila retina, a neurocrystalline lattice*. Dev. Biol., 1976. 53: p. 217-240.

- [3] Tomlinson, A., Ready, D. F., *Cell fate in the Drosophila ommatidium*. Dev. Biol., 1987. 123: p.264–275.
- [4] Hardie, R., In *Functional Organization of the Fly Retina*. ed.D. Ottoson, Berlin: Springer. 1985. 5: pp. 1-79.
- [5] Mollereau, B., Domingos, P. M., *Photoreceptor Differentiation in Drosophila: From Immature Neurons to Functional Photoreceptors*, Dev. Dyn., 2005. 232: p.585–592.
- [6] Perry, M. M., *Further studies on the development of the eye of Drosophila melanogaster. I. The ommatidia*. J. Morphol., 1968. 124: p.227-248.
- [7] Cagan, R. L., Ready, D. F., *The emergence of order in the Drosophila pupal retina*. Dev. Biol., 1989. 136: p. 346–362.
- [8] Waddington, C., Perry, M., *The ultrastructure of the developing eye of Drosophila*. Proc. R. Soc. London B Biol. Sci., 1960. 153: p. 155–178.
- [9] Longley Jr., R.L., Ready, D.F., *Integrins and the development of three-dimensional structure in the Drosophila compound eye*. Dev. Biol., 1995. 171: p. 415–433.
- [10] Pellikka, M., et al., Crumbs, the Drosophila homologue of human CRB1/RP12 is essential for photoreceptor morphogenesis. Nature, 2002. 416: p. 143–149.
- [11] Izaddoost, S., Nam, S.-C., Bhat, M. A., Bellen, H. J., Choi, K.-W., *Drosophila Crumbs is a positional cue in photoreceptor adherens junctions and rhabdomeres*. Nature. 416: p. 178–182.
- [12] Pichaud, F., Desplan, C., *A new view of photoreceptors*. Nature. 2002. 416: p. 139-140.
- [13] Akiko, K. S., O'Tousa, J.E., Ozaki, K. Ready, D.F., *Rab11 mediates post-Golgi trafficking of rhodopsin to the photosensitive apical membrane of Drosophila photoreceptors*. Development, 2005. 132: p. 1487-1497.
- [14] Li, B. X., Satoh, A.K., Ready, D., *Myosin V, Rab11, and dRip11 direct apical secretion and cellular morphogenesis in developing Drosophila photoreceptors*. J. Cell Biol., 2007. 177: p. 659-669.
- [15] Adesnik, M., Lande, M., Martin, T., Sabatini, D.D., *Retention of mRNA on the endoplasmic reticulum membranes after in vivo disassembly of polysomes by an inhibitor of initiation*. J. Cell Biol., 1976. 71: p.307–313.
- [16] Lande, M.A., Adesnik, M., Sumida, M., Tashiro, Y., Sabatini, D.D., *Direct association of messenger RNA with microsomal membranes in human diploid fibroblasts*. J. Cell Biol., 1975. 65: p.513–528.
- [17] Haas, I.G., Wabl, M., *Immunoglobulin heavy chain binding protein*. Nature, 1983. 306: p. 387-389.

- [18] Munro, S., Pelham, H.R., *An Hsp70-like protein in the ER: identity with the 78 kd glucose-regulated protein and immunoglobulin heavy chain binding protein*. Cell, 1986. 46: p. 291-300.
- [19] Dobson, C.M., *Principles of protein folding, misfolding and aggregation*. Semin. Cell Dev. Biol., 2004. 15: p. 3–16.
- [20] Karplus, M., Weaver, D.L., *Protein folding dynamics: the diffusion-collision model and experimental data*. Protein Sci., 1994. 3: p. 650–668.
- [21] Cheung, M.S., Garcia, A.E., Onuchic, J.N., *Protein folding mediated by solvation: water expulsion and formation of the hydrophobic core occur after the structural collapse*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 2002. 99: p. 685–690.
- [22] Meusser, B., Hirsch, C., Jarosch, E., Sommer, T., *ERAD: the long road to destruction*. Nat. Cell Biol., 2005. 7: p. 766–772.
- [23] Saliba, R.S., Munro, P.M., Luthert, P.J., Cheetham, M.E., *The cellular fate of mutant rhodopsin: quality control, degradation and aggresome formation*. J. Cell Sci., 2002. 115: p. 2907–2918.
- [24] Koo, E.H., Lansbury, P.T. Jr., Kelly, J.W., *Amyloid diseases: abnormal protein aggregation in neurodegeneration*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1999. 96: p. 9989–9990.
- [25] Marciniak, S.J., Ron, D., *Endoplasmic reticulum stress signaling in disease*. Physiol. Rev., 2006. 86: p. 1133-1149.
- [26] Schroder, M., Kaufman, R.J., *The mammalian unfolded protein response*. Annu. Rev. Biochem., 2005. 74: p. 739–789.
- [27] Ron, D., Walter, P., *Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response*. Nat. Rev. Mol. Cell Biol., 2007. 8: p. 519–529.
- [28] Harding, H.P., Calton, M., Urano, F., Novoa, I., Ron, D., *Transcriptional and translational control in the Mammalian unfolded protein response*. Annu. Rev. Cell Dev. Biol., 2002. 18: p. 575-599.
- [29] Bonifacino, J.S., Weissman, A.M., *Ubiquitin and the control of protein fate in the secretory and endocytic pathways*. Annu. Rev. Cell Dev. Biol., 1998. 14: p. 19–57.
- [30] Tsai, B., Ye, Y., Rapoport, T.A., *Retro-translocation of proteins from the endoplasmic reticulum into the cytosol*. Nat. Rev. Mol. Cell Biol., 2002. 3: p. 246–255.
- [31] DuRose, J.B., Tam, A.B., Niwa, M., *Intrinsic capacities of molecular sensors of the unfolded protein response to sense alternate forms of endoplasmic reticulum stress*. Mol. Biol. Cell, 2006. 17: p. 3095-3107.
- [32] Koizumi, N., Martinez, I.M., Kimata, Y., Kohno, K., Sano, H., Chrispeels, M.J., *Molecular characterization of two Arabidopsis Ire1 homologs, endoplasmic reticulum-located transmembrane protein kinases*. Plant Physiol., 2001. 127: p. 949–962.

- [33] Wang, X.Z., Harding, H.P., Zhang, Y., Jolicoeur, E.M., Kuroda, M., Ron, D., *Cloning of mammalian Ire1 reveals diversity in the ER stress responses*. EMBO J., 1998. 17: p.5708–5717.
- [34] Bertolotti, A., et al., *Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response*. Nat. Cell Biol., 2000. 6: p.326-32.
- [35] Okamura, K., et al., *Dissociation of Kar2p/BiP from an ER sensory molecule, Ire1p, triggers the unfolded protein response in yeast*. Biochem. Biophys. Res. Commun., 2000. 279: p.445-50.
- [36] Credle, J.J., et al., *On the mechanism of sensing unfolded protein in the endoplasmic reticulum*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2005. 102: p. 18773-18784.
- [37] Cox, J.S., Shamu, C.E., Walter, P., *Transcriptional induction of genes encoding endoplasmic reticulum resident proteins requires a transmembrane protein kinase*. Cell, 1993. 73: p. 1197-206.
- [38] Mori, K., et al., *A transmembrane protein with a cdc2+/CDC28-related kinase activity is required for signaling from the ER to the nucleus*. Cell, 1993. 74: p. 743-56.
- [39] Sidrauski, C., Walter, P., *The transmembrane kinase Ire1p is a site-specific endonuclease that initiates mRNA splicing in the unfolded protein response*. Cell, 1997. 90: p.1031-1039.
- [40] Chapman, R.E., Walter, P., *Translational attenuation mediated by an mRNA intron*. Curr. Biol., 1997. 7: p. 850-859.
- [41] Ruegsegger, U., Leber, J.H., Walter, P., *Block of HAC1 mRNA translation by long-range base pairing is released by cytoplasmic splicing upon induction of the unfolded protein response*. Cell, 2001. 107: p.103-114.
- [42] Yoshida, H., Matsui, T., Yamamoto, A., Okada, T., Mori, K., *XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor*. Cell, 2001. 107(7): p. 881-891.
- [43] Calton, M., Zeng, H., Urano, F., Till, J.H., Hubbard, S.R., Harding, H.P., Clark, S.G., Ron, D., *IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA*. Nature, 2002. 415: p. 92-96.
- [44] Yoshida, H., et al., *pXBP1(U) encoded in XBP1 pre-mRNA negatively regulates unfolded protein response activator pXBP1(S) in mammalian ER stress response*. J. Cell Biol., 2006. 172: p. 565-575.
- [45] Travers, K.J., Patil, C.K., Wodicka, L., Lockhart, D.J., Weissman, J.S., Walter, P., *Functional and genomic analyses reveal an essential coordination between the unfolded protein response and ER-associated degradation*. Cell, 2000. 101: p. 249-258.

- [46] Friedlander, R., Jarosch, E., Urban, J., Volkwein, C., Sommer, T., *A regulatory link between ER-associated protein degradation and the unfolded-protein response*. Nat. Cell Biol., 2000. 2: p.379-384.
- [47] Yoshida, H., et al., *A time-dependent phase shift in the mammalian unfolded protein response*. Dev. Cell, 2003. 4: p. 265-71.
- [48] Lee, A.H., Iwakoshi, N.N., Glimcher, L.H., *XBP-1 regulates a subset of endoplasmic reticulum resident chaperone genes in the unfolded protein response*. Mol. Cell Biol., 2003. 23: p.7448-59.
- [49] Srihuri, R., et al., *XBP1: a link between the unfolded protein response, lipid biosynthesis, and biogenesis of the endoplasmic reticulum*. J. Cell Biol., 2004. 167: p. 35-41.
- [50] Oda, Y., et al., *Derlin-2 and Derlin-3 are regulated by the mammalian unfolded protein response and are required for ER-associated degradation*. J. Cell Biol., 2006. 172: p. 383-93.
- [51] Urano, F., Wang, X., Bertolotti, A., Zhang, Y., Chung, P., Harding, H.P., Ron, D., *Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinase by transmembrane protein kinase IRE1*. Science, 2000. 287: p. 664-666.
- [52] Hollien, J. and J.S. Weissman, *Decay of endoplasmic reticulum-localized mRNAs during the unfolded protein response*. Science, 2006. 313: p. 104-107.
- [53] Ryoo, H.D.*, Domingos, P.M.*, Kang, M.-J., Steller, H., *Unfolded protein response in a Drosophila model for retinal degeneration*. EMBO J., 2007. 26: 242-252. (*equal contribution)
- [54] Berson, E.L., *Retinitis pigmentosa: Unfolding its mystery*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1996. 93: p.4526-4528.
- [55] Colley, N., Baker, E., Stamnes, M., Zuker, C., *The cyclophilin homolog ninaA is required in the secretory pathway*. Cell, 1991. 67: p. 255-263.
- [56] Colley, N.J., Cassill, J.A., Baker, E.K., Zuker, C.S., *Defective intracellular transport is the molecular basis of rhodopsin-dependent dominant retinal degeneration*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1995. 92: p. 3070-3074.
- [57] Kurada, P., O'Tousa, J.E., *Retinal degeneration caused by dominant rhodopsin mutations in Drosophila*. Neuron, 1995. 14: 571-579.
- [58] Davidson, F.F., Steller, H., *Blocking apoptosis prevents blindness in Drosophila retinal degeneration mutants*. Nature, 1998. 391: p. 587-591.
- [59] Moses, K., and Rubin, G.M. *Glass encodes a site-specific DNA-binding protein that is regulated in response to positional signals in the developing Drosophila eye*. Genes Dev., 1991. 5: p.583–593.
- [60] Young, S. L., Carthew, R. W., *Making a better RNAi vector for Drosophila: use of intron spacers*, Methods, 2003. 30: p.322–329

- [61] Golic, K. G., *Site-specific recombination between homologous chromosomes in Drosophila*. Science, 1991. 252: p.958-961.
- [62] Newsome, T.P., Sling, B., Dickson, B.J., *Analysis of Drosophila photoreceptor axon guidance in eye-specific mosaics*. Development, 2000. 127: p.851–860.
- [63] Pichaud, F., Desplan, C. *A new visualization approach for identifying mutations that affect differentiation and organization of the Drosophila ommatidia*. Development, 2001. 128: p.815–826
- [64] Walther, R. F., Pichaud, F., *Immunofluorescent staining and imaging of the pupal and adult Drosophila visual system*. Nat. Protoc., 2006. 6: p. 2635- 2642.
- [65] Bainbridge, S.P., Bownes, M., Staging the metamorphosis of Drosophila melanogaster. J. Embryol. Exp. Morphol., 1981. 66: p. 57–80.
- [66] Pichaud, F., Desplan, C. *A new visualization approach for identifying mutations that affect differentiation and organization of the Drosophila ommatidia*. Development, 2001. 128: p.815–826
- [67] Fritsch, E.F., Sambrook, J., Maniatis, T., *Molecular Cloning*. Cold Spring Harbor Laboratory Pr.,1989.
- [68] Tomlinson, A., *The cellular dynamics of pattern formation in the eye of drosophila*, Embryol. Exp. Morph., 1989. 85: p. 313-331.
- [69] Kumar, J. P., Ready, D. F., *Rhodopsin plays an essential structural role in Drosophila photoreceptor*. Development, 1995. 121: p. 4359-4370
- [70] Kumar, J. P., Bowman, J., O'Tousa, J.E., Ready, D.F., *Rhodopsin replacement rescues photoreceptor structure during a critical development window*. Dev. Biology, 1997. 188: p. 43–47
- [71] Chang, H.-Y., Ready, D.F., *Rescue of photoreceptor degeneration in rhodopsin-null drosophila mutants by activated Rac1*. Science, 2000. 290: p. 1978-1980.
- [72] Zelhof, A.C., Hardy, R.W., Becker, A., Zuker, C.S., *Transforming the architecture of compound eyes*. Nature, 2006. 443: p. 696- 699.
- [73] Ron, D., Hampton, R.Y., *Membrane biogenesis and the unfolded protein response*. J. Cell Biol., 2004. 167: p. 23–25.
- [74] Pillai, S., *Birth pangs: the stressful origins of lymphocytes*. J. Clin. Invest., 2005. 115: p. 224-227.
- [75] Souid, S., Lepesant, J.-A., Yanicostas, C., *The xbp-1 gene is essential for development in Drosophila*, Dev. Genes Evol., 2007. 217: p.159–167.
- [76] Mlodzik, M., *Local Mutagenesis by imprecise P-element excision*. In Lab Method Book 2nd ed., Ed. by Rubin, L., 1990. p. 84-86.

Anexo

Cruzamentos

i) Activação da via mediada por Irf1 e Xbp1

Estabelecimento do stock

$$\begin{array}{c}
 \text{♀ } w; GMR - Gal4; \frac{Sb}{TM 6B} \quad \times \quad \text{♂ } \frac{w}{y}; \frac{Sco}{Cyo}; \frac{uas - xbp1 - EGFP}{TM 6B} \\
 \swarrow \quad \searrow \quad \text{Não Sco e não Sb} \\
 \text{♀ } \frac{w}{y}; \frac{GMR - Gal4}{Cyo}; \frac{uas - xbp1 - EGFP}{TM 6B} \quad \times \quad \text{♂ } \frac{w}{y}; \frac{GMR - Gal4}{Cyo}; \frac{uas - xbp1 - EGFP}{TM 6B}
 \end{array}$$

Silenciamento do gene *mini-w⁺* em *GMR-Gal4*

$$\begin{array}{c}
 \text{♂ } \frac{w}{y}; \frac{GMR - Gal4}{Cyo}; \frac{uas - xbp1 - EGFP}{TM 6B} \quad \times \quad \text{♀ } w; pWIZ - w\Delta13; \frac{Sb}{TM 6B} \\
 \swarrow \quad \searrow \quad \text{Não Cyo, Não Sb e olhos light peach} \\
 \text{♀ } w; \frac{GMR - Gal4}{pWIZ - w\Delta13}; \frac{uas - xbp1 - EGFP}{TM 6B} \quad \times \quad \text{♂ } \frac{w}{y}; \frac{GMR - Gal4}{pWIZ - w\Delta13}; \frac{uas - xbp1 - EGFP}{TM 6B}
 \end{array}$$

ii) Geração de clones *ire1^{f02170}* no olho

Silenciamento do gene *mini-w⁺* presente em *PBac{WH}*^{f02170}

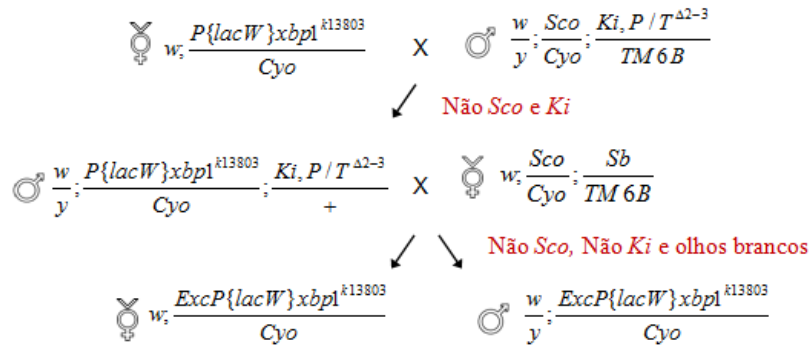
$$\begin{array}{c}
 \text{♀ } w; pWIZ - w\Delta13; \frac{Sb}{TM 6B} \quad \times \quad \text{♂ } \frac{w}{y}; \frac{Sco}{Cyo}; \frac{FRT 82 BPBac\{WH\}ire1^{f02170}}{TM 6B} \\
 \swarrow \quad \searrow \quad \text{Não Sco e Não Sb} \\
 \text{♀ } w; \frac{pWIZ - w\Delta13}{Cyo}; \frac{FRT 82 BPBac\{WH\}ire1^{f02170}}{TM 6B} \quad \times \quad \text{♂ } \frac{w}{y}; \frac{pWIZ - w\Delta13}{Cyo}; \frac{FRT 82 BPBac\{WH\}ire1^{f02170}}{TM 6B}
 \end{array}$$

Geração de clones nos olhos

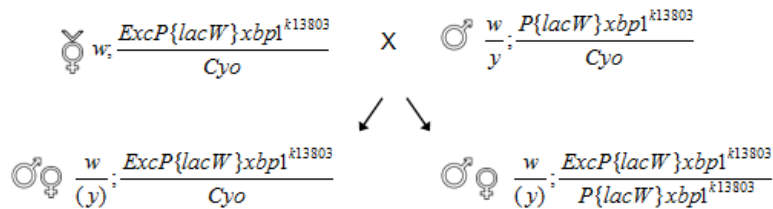
$$\begin{array}{c}
 \text{♂ } \frac{w}{y}; \frac{pWIZ - w\Delta13}{Cyo}; \frac{FRT 82 BPBac\{WH\}ire1^{f02170}}{TM 6B} \quad \times \quad \text{♀ } eyFlp; \frac{FRT 82 BubiGFP}{TM 6B} \\
 \swarrow \quad \searrow \quad \text{Não Tb e olhos light peach} \\
 \text{♀ } \frac{eyFlp}{+}; \frac{pWIZ - w\Delta13}{+}; \frac{FRT 82 BubiGFP}{FRT 82 BPBac\{WH\}ire1^{f02170}} \quad \times \quad \text{♂ } \frac{eyFlp}{y}; \frac{pWIZ - w\Delta13}{+}; \frac{FRT 82 BubiGFP}{FRT 82 BPBac\{WH\}ire1^{f02170}}
 \end{array}$$

iii) Excisão imprecisa de $P\{lacW\}^{k13808}$

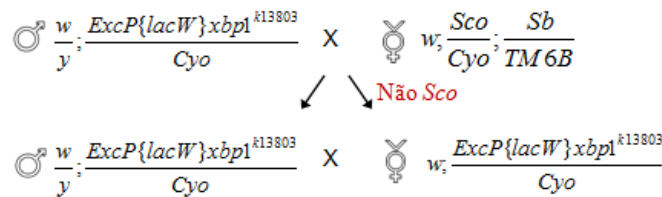
Obtenção de excisões de $P\{lacW\}xbp1^{k13803}$



Single-test cross das excisões obtidas

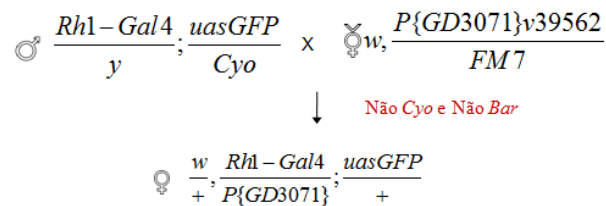


Estabelecimento de stock das excisões letais (quando não foram observados indivíduos $ExcP\{lacW\}xbp1/P\{lacW\}xbp1^{k13803}$)



iv) Knock-down de *Ire1*

Inserção de $P\{GD3071\}$ no 1º cromossoma



Inserção de $P\{GD3071\}$ no 3º cromossoma

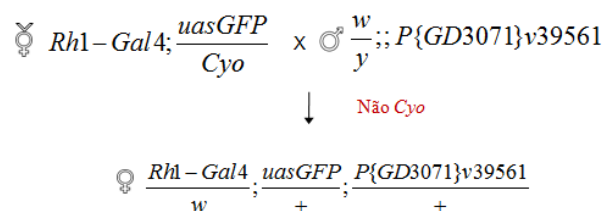
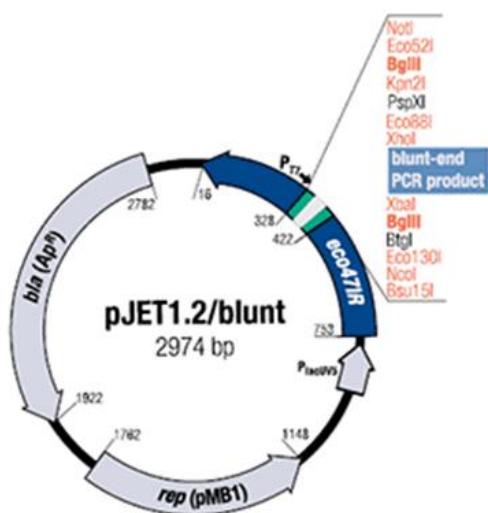


Tabela 1 – Oligonucleótidos utilizados nas reacções de PCR para rastrear a região genómica de *xbp1* e as suas proximidades nas excisões imprecisas obtidas.

Nome	Sequência	Localização no genoma
F xbp1 probe 2	5'aaacacgaacgaaaaaca3'	<i>Upstream xbp1</i>
R xbp1 probe 2	5'tgcctaccaccaactccatc3'	<i>Upstream xbp1</i>
F xbp1 probe 3	5'tccctcattacccaactcttcta3'	5'UTR <i>xbp1</i>
R xbp1 probe 3	5'taactgggtcggggctaaatgata3'	5'UTR <i>xbp1</i>
Sp1	5'acacaaccttctctcaaca3'	5' P{lacW}
xbp1-A	5'atggcaccacagcaaacaca3'	Sequência codificante <i>xbp1</i>
xbp1-E	5'cagcagcacaacaccagat3'	Sequência codificante <i>xbp1</i>
xbp1-F	5'cgctgacgactgtgtgcc3'	Sequência codificante <i>xbp1</i>
xbp1-D	5'tcagatcaaaactgggaaac3'	Sequência codificante <i>xbp1</i>
xbp1-3'sp	5'gttttttagttgataggctg3'	3'UTR <i>xbp1</i>
xbp1-rev	5'ggtttatatttgaatatttttag3'	3'UTR <i>xbp1</i>
F xbp1 probe 1	5'cacaatcgacgacggagaatgag3'	<i>Downstream xbp1</i>
R xbp1 probe 1	5'agtgcgttgctggctgagtgc3'	<i>Downstream xbp1</i>

A



B

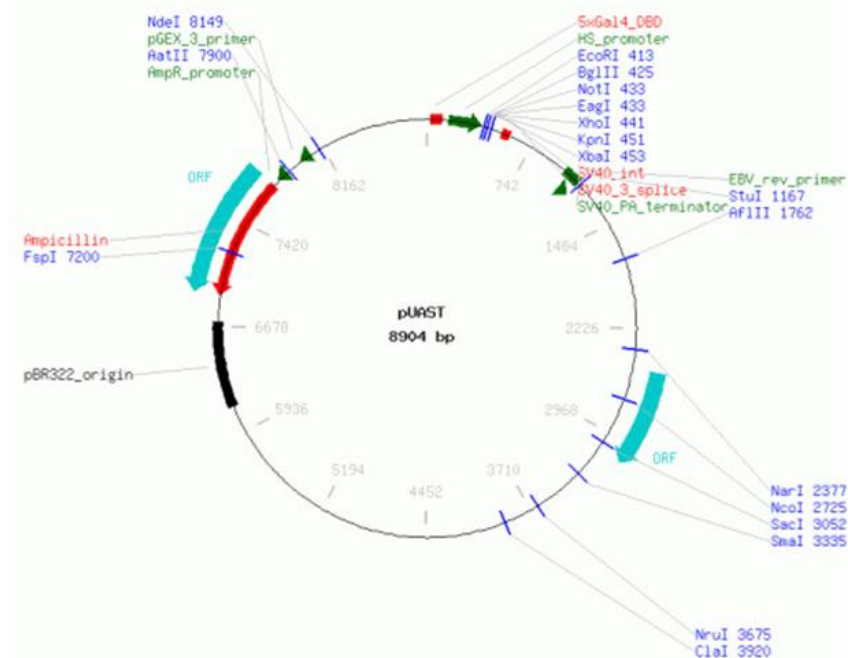


Figura 1. Mapas de restrição de pJET (A) e pUAST (B)..

Tabela 2 – Oligonucleótidos utilizados na sequenciação e clonagem do cDNA de Ire1.

Nome	Sequência
ire1-8	5'ggaagatctatgagattctgcgttggtg3'
ire1-9	5'cggggtacacctcaatcctgcgttgaaggtgg3'
pUAST F	5'gtccaattatgtcacacc3'
pUAST R	5'ctgaaatctgccaagaag3'
ire1-3	5'ttcattattggccaacaggc3'
ire1-4	5'cagcaaggtggttgaaagtc3'
ire1-5	5'cagaaatgatgagatcacagc3'
ire1-11	5'cagcaaccaagagacagat3'
ire1-10	5'tggacttgggtaatggacaa3'

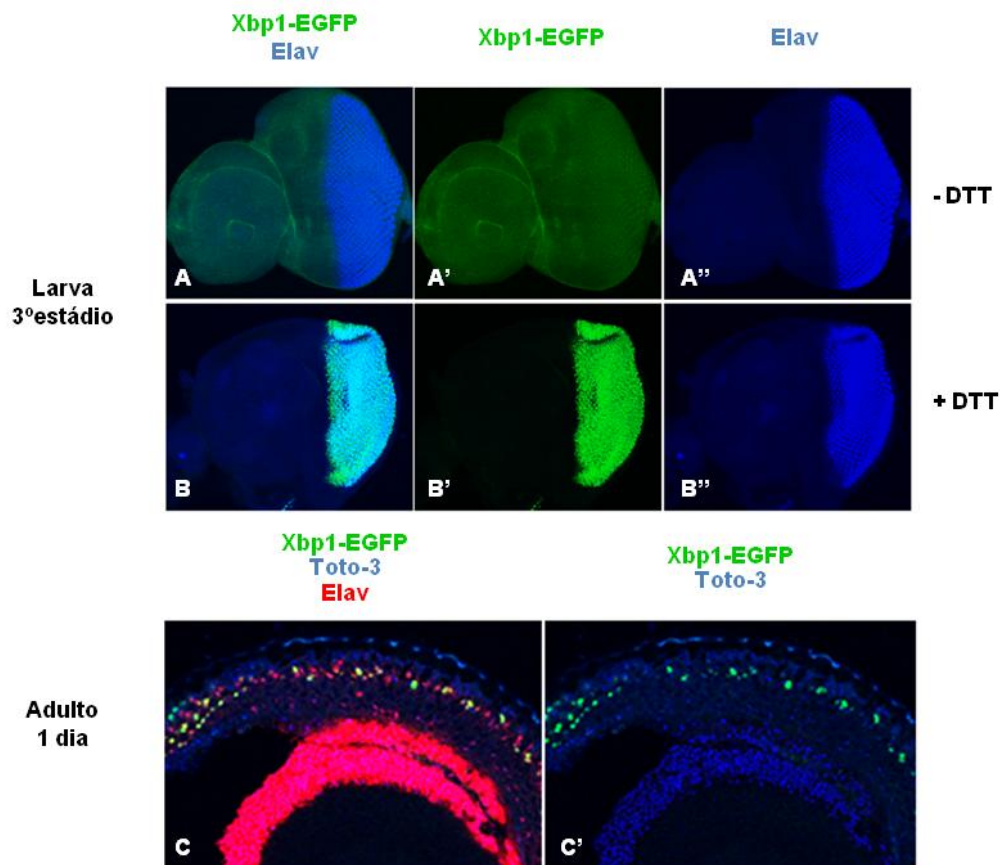


Figura 2 O repórter Xbp1-EGFP é activado por stress no RE (A,B) e localiza-se no núcleo (B). (A) O repórter Xbp1-EGFP (verde) não é activado endogenamente em discos imaginais do olho de larva do 3ºestádio. Os fotoreceptores marcados por Elav estão em azul (B) Em discos imaginais do olho de larva do 3º estágio tratados com DTT, há activação do repórter Xbp1-EGFP (em verde) nos fotoreceptores (em azul). O DTT é uma droga indutora de stress no RE que interfere com o normal *folding* das proteínas no RE, ao impedir a formação de ligações persulfureto. (C). O repórter Xbp1-EGFP tem um sinal de localização nuclear e a sua expressão co-localiza com a marcação nuclear (Toto-3 em azul). Neste caso, a activação de Xbp1-EGFP em fotoreceptores do olho de adulto é endógena (ausência de drogas indutoras de stress do RE). Os fotoreceptores estão marcados por Elav, em vermelho.

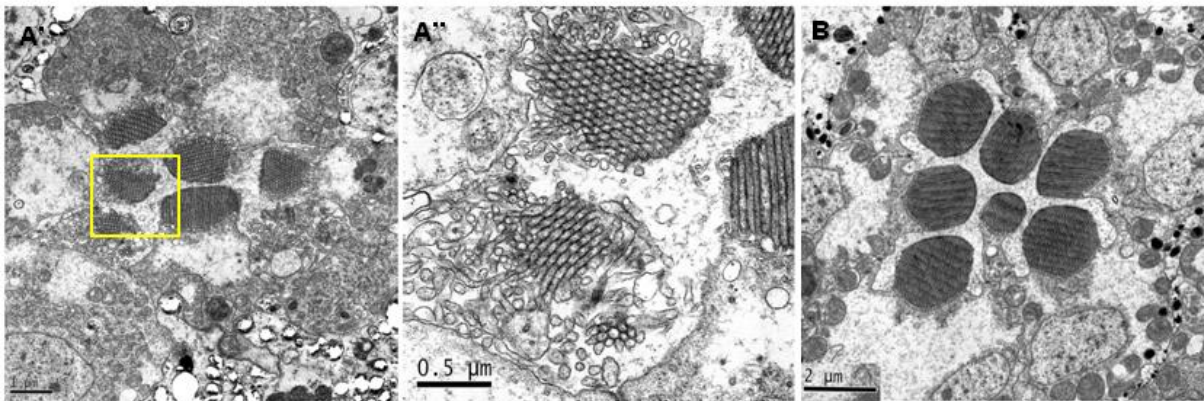


Figura 3. Defeitos estruturais em fotoreceptores de olho formado por um clone *ire1^{f02170}* em adulto. (B) A excisão precisa de *PBac{WH}* de *ire1^{f02170}* recupera o fenótipo selvagem. Imagem cedida por Pedro Domingos – dados não publicados.

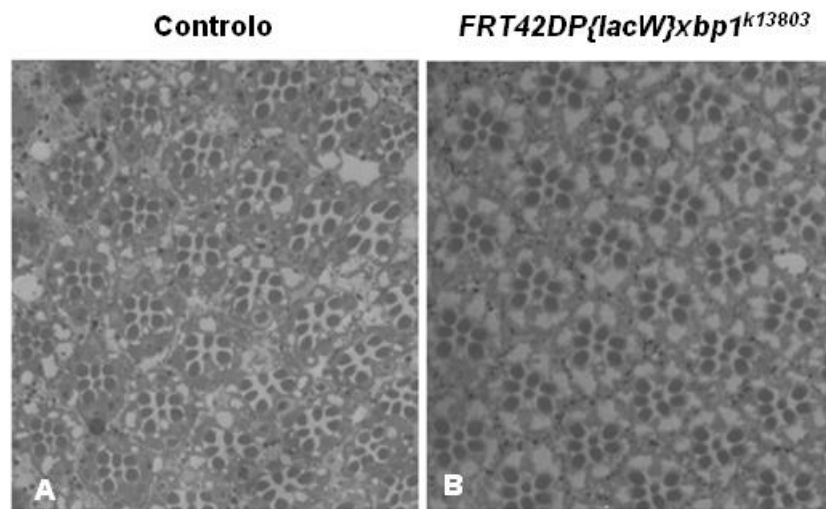


Figura 4. Secção tangencial de olho formado a partir de um clone *P{lacW}xbp1^{k13803}* em adulto. (A, B) Não são visíveis quaisquer alterações na morfologia dos fotoreceptores mutantes comparativamente ao controlo. Imagem cedida por Pedro Domingos – dados não publicados.